

EVALUACIÓN DE LA IMPLEMENTACIÓN DE SENSORES FONÓNICOS, EN LA CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS EN MEDIOS LÍQUIDOS.

SARA OCAMPO MORENO

**Trabajo de grado para optar al título de
INGENIERA BIOMÉDICA**

**DIRECTOR: SIMÓN VILLA ARANGO
JEFE INNOVACIÓN TECNOLÓGICA
DIRECTOR INCUBBA**



**UNIVERSIDAD EIA
INGENIERÍA BIOMÉDICA
ENVIGADO
2018**

Dedico este Trabajo de Grado a mi padre por hacer de la academia una forma de vida e incluirme a mí en su proyecto. A él que es el eco detrás de cada página. Y a mi madre porque sin su ejemplo, su compañía y ternura no habría sido posible escoger este camino. A ella que iluminó cada tramo y lo sigue haciendo.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

AGRADECIMIENTOS

A Simón Villa, porque este trabajo no hubiera sido posible sin su dirección, dedicación y apoyo.

A mi familia por su apoyo incondicional a lo largo de este viaje.

A todos los que de una u otra manera estuvieron involucrados en este proceso.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN.....	13
1. PRELIMINARES.....	15
1.1 Planteamiento del problema	15
1.2 Objetivos del proyecto	16
1.2.1 Objetivo General.....	16
1.2.2 Objetivos Específicos	16
1.3 Marco de referencia.....	16
1.3.1 Estado del Arte.....	16
1.3.2 Marco Teórico	20
2. METODOLOGÍA.....	27
2.1 Desarrollo de un protocolo para la caracterización de soluciones con propiedades acústicas equivalentes a las de un cultivo microbiológico en medio líquido por medio de sensores fonónicos.	27
2.2 Preparación de soluciones	39
2.2.1 Solución Salina.....	39
2.2.2 Comparación con otras técnicas convencionales (Uso de Glicerol).....	40
2.3 Caracterización de las variaciones en las propiedades acústicas de las soluciones equivalentes con un sensor fonónico.	42
2.4 Evaluación del desempeño de los sensores fonónicos en la caracterización de cultivos microbiológicos, comparando los resultados obtenidos con los de una tecnología existente.....	44
2.5 Propuesta de un protocolo mejorado con base en los resultados obtenidos para la caracterización de cultivos microbiológicos en medios líquidos, usando sensores fonónicos.....	46

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

3. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	48
4. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES	59
REFERENCIAS	60

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Resumen de los aportes de los artículos científicos encontrados en la búsqueda bibliográfica para la elaboración del protocolo.	30
Tabla 2. Porcentaje de Salinidad que deben tener las soluciones equivalentes de acuerdo con la Ecuación 1.	36
Tabla 3. Propiedades y dimensiones de las capas del cristal fonónico que se usó.	37
Tabla 4. Cálculo de masa de NaCl para cada una de las soluciones planteadas.....	40
Tabla 5. Cálculo de volumen de Glicerol y Agua Destilada para cada una de las soluciones planteadas	42

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Reflexión y refracción de una onda (TECSUP, 2018)	22
Figura 2. Gráfica de la representación de una onda de alta frecuencia respecto a una onda de baja frecuencia (De La Cruz Reyes, 2016).	22
Figura 3. Ecuación de la Velocidad del Sonido (Rod Nave, Velocidades de Ondas, 2009)	23
Figura 4. a) Cristales fonónicos de 1D, 2D y 3D, hechos de dos materiales elásticos diferentes y dispuestos periódicamente. b) Ejemplo de la gráfica de la banda rechazada para un cristal fonónico bidimensional, la región PBG representa dicha banda. c) Ejemplos de cristales fonónicos en varias dimensiones, y con diferentes aplicaciones (Maldovan, 2013).	24
Figura 5. Diferentes geometrías regulares e irregulares de cristales fonónicos en 3D (Lucklum & Vellekoop, 2016).	25
Figura 6. Resultados más significativos del Artículo 1 encontrado en la búsqueda bibliográfica como referencia para la elaboración del protocolo (L. Elvira, 2010).	32
Figura 7. Resultados más significativos del Artículo 2 encontrado en la búsqueda bibliográfica como referencia para la elaboración del protocolo (B. Alouache, 2015).	33
Figura 8. Resultados más significativos del Artículo 4 encontrado en la búsqueda bibliográfica como referencia para la elaboración del protocolo (Resa, Bolumar, Elvira, Pérez, & Montero de Espinosa, 2007).	34
Figura 9. Analizador de Espectros RIGOL DSA815	38
Figura 10. Cristal fonónico en el centro de los transductores, que a su vez están conectados al analizador de espectros.	39
Figura 11. Estructura del Sensor Fonónico usado en el trabajo de grado (Villa-Arango, Betancur Sánchez, Torres, Kyriacou, & Lucklum, 2017). Sensor fonónico con un solo modo de defecto.	43
Figura 12. Respuesta en frecuencia del Sensor que se usó (Villa-Arango, Betancur Sánchez, Torres, Kyriacou, & Lucklum, 2017).	44
Figura 13. Resultados del primer experimento.	49

Figura 14. Acercamiento de los resultados del primer experimento	50
Figura 15. Frecuencia de aparición del máximo de interés respecto a la Concentración Salina en Agua destilada para el primer experimento	51
Figura 16. Acercamiento de los resultados del segundo experimento con Glicerol	51
Figura 17. Frecuencia de aparición del máximo de interés respecto a la concentración de Glicerol en Agua destilada para el segundo experimento.	52
Figura 18. Tabla donde se indican las diferentes concentraciones de glicerol usadas en el estudio de QCM (Montagut Ferizzola, 2011).....	53
Figura 19. Resultados encontrados en el estudio de QCM con glicerol (Montagut Ferizzola, 2011).	53
Figura 20. Comparación de uno de los resultados encontrados en la bibliografía con los resultados presentados en este trabajo.	55
Figura 21. Resultados experimentales del sensor fonónico como biosensor utilizando diferentes concentraciones de soluciones de BSA en solución amortiguadora PBS.	56
Figura 22. Frecuencia del pico máximo de transmisión del sensor fonónico como biosensor utilizando diferentes concentraciones de soluciones de BSA en solución amortiguadora PBS	56
Figura 23. Medición de control del sensor fonónico como biosensor con una solución de BSA en PBS a una concentración de 50 ng/mL.....	57
Figura 24. Frecuencia del pico de máxima transmisión del sensor fonónico como biosensor utilizando diferentes concentraciones de soluciones de BSA en solución amortiguadora PBS. Los datos se adquirieron después de lavar el biosensor PnC e introducir PBS en la cavidad resonante.	58

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Cálculo de impedancia acústica efectiva para cada capa.	26
Ecuación 2. Función lineal de Salinidad a partir de la velocidad del sonido (S. J. Kleis, 1990).	35
Ecuación 3. Fórmula de Porcentaje Peso a Peso para calcular la masa de NaCl para las diferentes concentraciones de Solución Salina.	40
Ecuación 4. Masa del Solute despejado, a partir de la Ecuación 2.	40
Ecuación 5. Fórmula de Porcentaje Volumen a Volumen para encontrar la cantidad de Glicerol que se debía agregar al agua destilada para las diferentes concentraciones.	41
Ecuación 6. Volumen del Solute despejado, a partir de la Ecuación 5.	41
Ecuación 7. Cálculo para encontrar el Volumen del Solvente, teniendo en cuenta cuánto volumen de solución de desea y cuánto soluto se calculó.	42

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo 1. Códigos de MATLAB para el procesamiento y Visualización de los Datos.....	64

RESUMEN

Las pruebas cerca al paciente (PoCT) para detectar enfermedades infecciosas se han venido desarrollando con más frecuencia con el paso de los años pues disminuyen el tiempo de espera para los resultados de los mismos. Debido a esto, se hace necesario el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan tener información relevante acerca del crecimiento de patógenos de interés en cultivos microbiológicos en el menor tiempo posible, haciendo uso de nuevas tecnologías de medición como los cristales fonónicos. El uso de los cristales fonónicos como sensores en el campo de la salud es relativamente nuevo; hasta ahora no hay muchos dispositivos que usen las propiedades de estos cristales para adquirir variables asociadas al estado de salud de las personas. El control sin precedentes de la transmisión de ondas acústicas y elásticas que los cristales fonónicos otorgan los posiciona como una de las principales tecnologías para el desarrollo de nuevas aplicaciones, entre las que se encuentran las pruebas cerca al paciente. El diseño de los cristales fonónicos es muy flexible y permite tener sensores con dimensiones muy pequeñas facilitando su portabilidad y solucionando así parte del problema.

Este proyecto busca evaluar la implementación de los cristales fonónicos como sensores para caracterizar cultivos microbiológicos y su crecimiento, en medios líquidos. El diseño metodológico parte de la búsqueda de características o propiedades acústicas de los cultivos a medida que se da el crecimiento en el cultivo, la realización de un protocolo para caracterizar una solución equivalente con propiedades acústicas equivalentes a las de un cultivo microbiológico por medio de sensores fonónicos, la evaluación del desempeño de los cristales fonónicos en comparación con otras tecnologías existentes, seleccionando la Microbalanza de Cuarzo (QCM) con soluciones a diferentes concentraciones de glicerol en agua destilada. Finalmente, se realizaron unas pruebas inmovilizando un agente de biorreconocimiento que permitiera mejorar la sensibilidad o especificidad del cristal, por medio de una reacción antígeno-anticuerpo, el agente seleccionado fue la proteína BSA.

Los resultados del proyecto evidenciaron que el cristal fonónico puede ser aplicado como sensor para esto, debido a que se logró mostrar desplazamientos en los espectros de frecuencia obtenidos, las evaluaciones adicionales tanto de comparación con QCM, como de implementación de agente de biorreconocimiento también mostraron el potencial que estas tecnologías presentan y que se mostrará en el contenido de este trabajo.

Se pudo evidenciar que con cambios pequeños en las concentraciones de la muestra el sensor logra detectar estos cambios por medio del desplazamiento en el pico máximo de frecuencia.

Palabras clave: Sensores fonónicos, cultivo microbiológico, velocidad del sonido, ultrasonido

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

ABSTRACT

Point of Care Testing (PoCT) to detect infectious diseases have been developing more frequently over the years as they reduce the waiting time for the diagnosis of infectious disease. Because of it, it is necessary to develop new technologies that allow having relevant information about the growth of pathogens of interest in microbiological cultures in the shortest time possible, making use of new measurement technologies such as phonic crystals. The use of Phononic crystals as sensors in the field of health is relatively new; in the recent days, there are not many devices that use the properties of these crystals to acquire variables associated with the health status of people. The unprecedented control of the transmission of acoustic and elastic waves that the phonic crystals grant positions them as one of the main technologies for the development of new applications, among which are the point of care testing. The design of the Phononic crystals is very flexible and allows to have sensors with very small dimensions facilitating their portability and thus solving part of the problem.

This project aims to evaluate the implementation of phonic crystals as sensors to characterize microbiological cultures and their growth, in liquid media. The methodological design starts from the search of characteristics or acoustic properties of the microbiological cultures as growth occurs in the culture, the realization of a protocol to characterize an equivalent solution with acoustic properties equivalent to those of a microbiological culture by the use of Phononic sensors, the evaluation of the performance of Phononic crystals compared to other existing technologies, selecting the Quartz Microbalance (QCM) with solutions at different concentrations of glycerol in distilled water. Finally, some tests were carried out immobilizing a biorecognition agent that would allow to improve the sensitivity or specificity of the crystal, by means of an antigen-antibody reaction, the selected agent was the BSA protein.

The results of the project showed that Phononic crystals can be applied as a sensor for the evaluation of microbiological growth, because it was possible to show displacements in the obtained frequency spectrums, the additional evaluations both of comparison with QCM, and of implementation of biorecognition agent also showed the potential that these technologies present and that will be shown in the content of this work.

It was evidenced that with small changes in the concentrations of the sample the sensor manages to detect these changes by means of the displacement in the maximum peak of frequency.

Keywords: Phononic sensors, microbiological culture, speed of sound, ultrasound.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día uno de los principales métodos utilizados para el diagnóstico de enfermedades y patologías, es un examen médico realizado por un profesional de la salud o una prueba de laboratorio clínico, donde se examinan muestras de sangre, orina o tejidos corporales con el fin de detectar algún organismo patógeno en el cuerpo del paciente que dé información sobre su estado de salud.

Uno de los grandes retos en la caracterización de pruebas microbiológicas, es la temprana detección del crecimiento del organismo de interés que en la mayoría de casos se debe identificar por medio de una prueba de laboratorio clínico de carácter microbiológico, en la cual se prepara un cultivo celular derivado de una muestra tomada del paciente con características específicas, que permiten luego de un tiempo específico, determinar por medio de pruebas ópticas, químicas, o electroquímicas entre otras, la presencia de este agente patógeno. Este método puede tardar desde 24 horas hasta 4 semanas o más para arrojar un resultado confiable, ocasionando una demora significativa en el inicio del tratamiento del paciente.

Debido a la creciente necesidad de contar con nuevas herramientas diagnósticas que ayuden a reducir el tiempo en el que se toman decisiones acerca del tratamiento del paciente en la prestación del servicio de salud, en este proyecto se evaluó la implementación de sensores fonónicos en la caracterización de una solución equivalente a la de un cultivo microbiológico. El sensor permite evaluar los cambios de velocidad del sonido en muestras a diferentes concentraciones para finalmente identificar la presencia de microorganismos patógenos en cultivos microbiológicos.

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados se definieron las siguientes etapas principales: búsqueda de requerimientos y materiales, elaboración de un protocolo que permita realizar la caracterización de dicha solución equivalente, comparación de los datos obtenidos con otras tecnologías existentes y finalmente la elaboración de un protocolo mejorado que asegure la correcta realización y reproducibilidad de las mediciones, según lo observado y experimentado durante la ejecución del proyecto.

La primera etapa fue una búsqueda bibliográfica que buscaba identificar investigaciones previas donde se hubiese usado la velocidad del sonido como variable de interés en el crecimiento de cultivos microbiológicos. Durante la ejecución de esta etapa se encontró que el ultrasonido era comúnmente usado en estas pruebas. Esta búsqueda permitió identificar las velocidades del sonido y las concentraciones que debía tener una potencial solución

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

equivalente para facilitar su evaluación con los cristales fonónicos, de manera que se procedió a calcular y preparar la concentración de cada una de las soluciones en función de las velocidades del sonido identificadas en la búsqueda bibliográfica.

La segunda etapa consistió en la elaboración e implementación de un protocolo para realizar las mediciones. El diseño del protocolo tuvo en cuenta principalmente las características del sensor fonónico a utilizar, así como la preparación y manipulación de las muestras de soluciones equivalentes. En el protocolo se incluyó igualmente una descripción del proceso de toma de las medidas con los equipos de laboratorio. Finalmente, durante esta segunda etapa se desarrollaron a su vez pruebas experimentales siguiendo el protocolo previamente elaborado.

La tercera etapa contempla la realización de pruebas experimentales adicionales con el objetivo de comparar el sensor fonónico con tecnologías existentes. Se prepararon unas soluciones utilizando como analito diferentes concentraciones de glicerol en agua destilada, la tecnología seleccionada para realizar la comparación fue la Microbalanza de Cuarzo (QCM), debido a que esta es hoy en día la tecnología resonante con mejores resultados que se han presentado hasta ahora, así mismo, se han utilizado ampliamente en aplicaciones como biosensores. El glicerol se seleccionó como analito ya que este ha sido ampliamente utilizado con QCM lo que facilitaba la comparación. Posterior a esto, se realizaron pruebas adicionales para evaluar la implementación de una estrategia para aumentar la especificidad del sensor. En este ensayo experimental final se inmovilizó sobre la superficie de la cavidad resonante del sensor fonónico un agente de biorreconocimiento para mejorar su sensibilidad y especificidad. Para estas pruebas se seleccionó como analito la proteína BSA. Esta proteína es una proteína transportadora extracelular que se expresa en diferentes estructuras celulares. Se preparó el anticuerpo para esta proteína en soluciones a diferentes concentraciones en PBS y luego se insertó en la cavidad resonante donde previamente se había inmovilizado el antígeno. Al realizar las pruebas, se evaluó la unión antígeno anticuerpo en la cavidad resonante del sensor fonónico y cómo esta influenciaba cambios en la respuesta en frecuencia del sensor.

En la cuarta y última etapa, se planteó un nuevo protocolo para futuras pruebas. Este nuevo protocolo tomó como base el protocolo inicialmente planteado y busca mejorar el desempeño del sensor en este tipo de pruebas.

1. PRELIMINARES

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día, los métodos tradicionales que se usan para el diagnóstico de enfermedades infecciosas son por medio de la obtención de una muestra del paciente que se envía a un laboratorio de microbiología clínica para evaluar la presencia de algún microorganismo patógeno, ya sea virus, bacterias, hongos o parásitos. El método de evaluación de la presencia de un patógeno en una muestra ya sea de tejidos, líquidos o excreciones del paciente es la visualización microscópica de la muestra o la proliferación de los patógenos en el medio; estas técnicas se consideran confiables, pero por lo general son muy lentas (McAdam J. & Onderdonk B., 2016). Una vez se tiene la muestra a analizar, se deposita en una placa o tubo de ensayo que contiene nutrientes que facilitan el crecimiento de los microorganismos. Hay muchos microorganismos que se pueden cultivar con facilidad, sin embargo, existen bacterias que no se pueden cultivar o que el tiempo que se debe esperar para su visualización en el microscopio puede ser de varias semanas; para el caso de los virus la mayoría no se pueden cultivar (Hazen C., 2017).

Dentro de los aportes que se han desarrollado recientemente para disminuir el tiempo que se debe esperar para poder diagnosticar adecuadamente una enfermedad infecciosa se encuentran los sistemas conocidos con PoCT (Test de diagnóstico rápido, conocido en inglés como Point of Care Testing). Las PoCT son definidas por la Norma Técnica Colombiana NTC-6154 de 2015 como “Pruebas que son ejecutadas cerca del sitio de ubicación del paciente cuyo resultado lleva posiblemente a cambios en el cuidado del paciente” (Norma Técnica Colombiana, 2015). Las ventajas de este tipo de pruebas son que como el examen se realiza en el sitio donde se encuentra ubicado el paciente no se requiere un transporte de la muestra, por otra parte, se puede hacer una mejor organización de las muestras que en últimas permite la priorización de pacientes dependiendo de la condición de cada uno. Otra de las ventajas es que se puede otorgar una atención mucho más completa en una sola cita (Ospina, 2016). Sin embargo, estas pruebas cerca al paciente pueden presentar algunas desventajas respecto a las pruebas que se realizan en laboratorios clínicos. Teniendo en cuenta que en ocasiones la prueba no se realiza propiamente en un laboratorio clínico, el análisis lo hace personal de la clínica que no ha sido formado para la ejecución de pruebas diagnósticas; en consecuencia, las PoCT tienen mayor probabilidad de presentar errores en las mediciones debido a la inadecuada manipulación de dispositivos, reactivos o muestras biológicas (Abel Castaño).

La reciente introducción de nuevos sensores ha traído muchas oportunidades para desarrollar nuevas aplicaciones en la industria biomédica. Los cristales fonónicos hacen parte de los más recientes sensores resonantes y son estructuras periódicas compuestas

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

de dos o más materiales que permiten controlar de maneras antes impensadas la transmisión de ondas acústicas y elásticas. La introducción de modos de defecto con líquidos en la red cristalina crea modos resonantes adicionales que pueden ser caracterizados y permiten determinar las propiedades acústicas de un analito confinado en una cavidad (S. Villa-Arango, 2017).

Debido a la creciente necesidad de contar con herramientas diagnósticas que ayuden a reducir el tiempo en el que se toman las decisiones acerca del tratamiento del paciente en la prestación del servicio de salud, se hace necesario el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan tener información relevante acerca del crecimiento de patógenos de interés en cultivos microbiológicos en el menor tiempo posible, haciendo uso de nuevas tecnologías de medición como los cristales fonónicos.

1.2 OBJETIVOS DEL PROYECTO

1.2.1 Objetivo General

Evaluar la implementación de sensores fonónicos en la caracterización de cultivos microbiológicos en medios líquidos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Desarrollar un protocolo para la caracterización de soluciones con propiedades acústicas equivalentes a las de un cultivo microbiológico en medio líquido por medio de sensores fonónicos.
- Caracterizar las variaciones en las propiedades acústicas de las soluciones equivalentes con un sensor fonónico siguiendo el protocolo diseñado.
- Evaluar el desempeño del sensor fonónico en la caracterización de cultivos microbiológicos, comparando los resultados obtenidos en soluciones equivalentes con los de una tecnología existente.
- Proponer un protocolo mejorado con base en los resultados obtenidos para la caracterización de cultivos microbiológicos en medios líquidos, usando sensores fonónicos.

1.3 MARCO DE REFERENCIA

1.3.1 Estado del Arte

Las pruebas con cultivos celulares se remontan a muchos años atrás, la historia de la microbiología se puede ver representada en cuatro periodos fundamentales: el primer

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

periodo, fue desde la antigüedad hasta los primeros microscopistas; es decir, fue netamente especulativo. El segundo periodo, inició con el descubrimiento de los microorganismos (más específicamente las bacterias, los protistas de vida libre, los nematodos microscópicos y rotíferos, entre otros) por parte de Leeuwenhoek en la mitad del siglo XIX (Waggoner, s.f.). El tercer periodo, se dio a finales del siglo XIX, en donde el famoso químico Louis Pasteur aportó grandes descubrimientos a la humanidad en temas referentes a la microbiología al encontrar diferentes vacunas, así como determinar que existen diferentes gérmenes que causan enfermedades a los seres vivos (iWonder, 2015). El cuarto periodo, el cual llega hasta la actualidad, se destaca por los avances en materia de complejidad fisiológica de los microorganismos, su bioquímica, genética, entre otros, que permitieron desarrollos principalmente en virología e inmunología (Iáñez, 1998).

Para realizar un adecuado diagnóstico de una enfermedad infecciosa, es necesario que la muestra biológica del paciente se prepare en un cultivo celular en un medio específico y que se brinden todas las condiciones necesarias para crecer en un ambiente controlado. Dependiendo del microorganismo patógeno objetivo, después de cierto tiempo se espera que dicho patógeno haya crecido lo suficiente para detectar una clonación, y así, poder inferir si hay o no presencia y por lo tanto infección. Este proceso de proliferación del patógeno puede tardar entre 24 horas y 3 días debido a que el microorganismo debe proliferar lo suficiente como para ser observado en el microscopio. Las técnicas de observación en el microscopio pueden ser directas, en donde se busca identificar el agente de interés observando los antígenos del microorganismo o su información genética, como lo son los ácidos nucleicos, por medio de la técnica de PCR; o indirectas, los cuales permiten reconocer la respuesta inmune que se desarrolla dentro del cuerpo humano, detectando los anticuerpos específicos por medio de técnicas inmunológicas (D. Sandín, 2008).

PERSPECTIVA MUNDIAL

A raíz de las diferentes epidemias que se han dado a lo largo de la historia, diferentes organizaciones se han creado principalmente en la Organización Mundial de la Salud, en pro de la detección temprana de enfermedades que potencialmente llevarán a una epidemia mundial. Estas organizaciones reúnen diferentes profesionales que aportan a la identificación temprana de un brote. Adicionalmente, se han establecido diferentes redes de vigilancia que incluyen profesionales en epidemiología, científicos, funcionarios del ministerio, trabajadores de salud, entre otros, para contribuir en la capacitación de la comunidad así como en la investigación de la enfermedad (Steele, Orefuwa, & Dickmann, 2016).

La principal organización es la Red Mundial de Alerta y Respuesta ante Brotes Epidémicos (GOARN, por sus siglas en inglés), la cual busca que ante la presencia de un brote se

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

cuenten con los recursos humanos y técnicos en los lugares donde más se necesitan. La Red Mundial de Alerta y Respuesta ante Brotes Epidémicos plantea que la seguridad sanitaria mundial sea velada por tres modos: “Combatiendo la propagación internacional de brotes epidémicos, velando que llegue rápidamente a los Estados afectados la asistencia técnica apropiada y contribuyendo a la preparación para epidemias y al aumento de la capacidad a largo plazo” (OMS, 2017).

Complementando la Red Mundial de Alerta y Respuesta ante Brotes Epidémicos, la OMS en 2007 propone el Reglamento Sanitario Internacional (RSI) que busca ayudar a la comunidad internacional a prevenir enfrentar los riesgos de salud pública que se pueden desencadenar en un paso fronterizo, los cuales pueden amenazar la salud a nivel mundial. Esta herramienta es un instrumento jurídico que exige cumplir a los Estados Miembros de la OMS, fortalecer los sistemas de vigilancia que permitan notificar a tiempo los eventos de salud pública (OMS, 2017).

Por otro lado, se encuentra el Sistema Global de Vigilancia y Respuesta a la Influenza (GISN), el cual ha llevado la vigilancia virológica global de la influenza. Este sistema perteneciente a la OMS, monitorea de evolución del virus de influenza y facilita sugerencias en temas de diagnósticos de laboratorio, vacunas, susceptibilidad antiviral y evaluación de riesgos. Asimismo, sirve como un mecanismo de alerta a nivel mundial para el momento que se presente la influenza como un potencial pandémico (OMS, 2017).

En 2017, se condujo una investigación en donde detectaron que la neuraminidasa es un biomarcador importante para enfermedades infecciosas. Esta enzima se ha encontrado en muchas bacterias patógenas y virus de la influenza, por lo tanto, se desarrolló un ensayo para detectar la actividad de la neuraminidasa. Para los virus, esta enzima facilita la liberación del virus que recién se ha formado a nuevas células, para el caso de las bacterias, induce la patógenos y tiene diferentes efectos dependiendo del tipo de bacteria: la neuraminidasa en la *Vibrio cholerae* (bacteria que produce el cólera) aumenta la actividad de la toxina, en la *Pseudomonas aeruginosa* induce la formación de biopelículas en la colonización del tracto respiratorio, en la neuraminidasa NanA y NanB de *Streptococcus pneumoniae* es fundamental su presencia para que se dé una infección en el tracto respiratorio y se dé sepsis. El ensayo era electroquímico, por medio de una sonda para que actuara como sustrato de la neuraminidasa. El resultado de la hidrólisis daba una liberación de p-aminofenol, el cual se controló por medio de Voltamperometría de barrido lineal (Mubarak, Mani, Huang, Chang, & Huang, 2017).

La tuberculosis sigue siendo una de las enfermedades infecciosas más importantes del mundo, con una cifra cerca a los 9 millones de personas que han desarrollado esta enfermedad anualmente y 1.6 millones que mueran a causa de esta. El diagnóstico convencional para esta enfermedad continúa siendo pruebas biológicas básicas que están

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

basadas en el uso de la microscopía en muestras de sangre o en pruebas de tuberculina en la piel. Estos métodos usados comúnmente tienen grandes limitaciones y no posee un buen rendimiento en personas infectadas por el virus VIH, además de que puedan tardar entre 4 a 8 semanas para dar un resultado confiable (Minion, Sohn, & Pai, 2009). En un artículo publicado en el 2017 se enuncian diferentes métodos de detección rápida de la tuberculosis. Dentro de ellos se encuentran los Biomarcadores, los cuales abarcan la serología que no es recomendada por la OMS, la detección de antígenos tales como el lipoarabinomano (liposacáridos presentes en la pared bacteriana), la detección de compuestos orgánicos volátiles en donde se pide al paciente que tosa después de haberse realizado una nebulización con solución salina). Adicional a los biomarcadores se encuentra la detección de tuberculosis por medio de muestras clínicas, el Ensayo del Fago Amplificado Biológicamente se basa en la capacidad del fago para lisar células de un cultivo de la bacteria de la tuberculosis, otro ensayo muy relacionado al anterior, un fago se incorpora a un gen de la luciferasa y si hay presencia de tuberculosis en la muestra se causa la luminiscencia la cual se puede medir con un luminómetro, este ensayo se conoce en inglés como “Luciferase Reporter Phage Assay” (Viñuelas-Bayón, Vitoria, & Samper, 2017).

Actualmente las pruebas más sensibles y rápidas para determinar la presencia de un microorganismo patógeno son las técnicas moleculares y genotípicas, aunque su costo es bastante elevado. Estas pruebas consisten en la detección de secuencias específicas del ADN o del ARN del microorganismo, tienen una alta especificidad, sensibilidad, rapidez. Por otro lado, no es necesario que la muestra se lleve a un cultivo celular por lo que evita los sesgos que pueden aparecer en un medio de cultivo. Sin embargo, esta tecnología altamente avanzada, posee ciertas desventajas que aún debe ser mejoradas, como la incapacidad de distinguir entre organismos vivos o muertos, para utilizar esta tecnología se debe conocer la secuencia de nucleótidos específicas para cada patógeno que se desea investigar, el personal debe ser altamente calificado para hacer uso de los dispositivos moleculares los cuales a su vez son específicos para cada tipo de diagnóstico y altamente costosos y finalmente, se deben desarrollar diferentes etapas los cuales incrementan la posibilidad de errores, además de presentar una mayor posibilidad de casos con falsos positivos y falsos negativos (R. Rodríguez-Herrera, 2009).

En cuanto al desarrollo de tecnologías basadas en propiedades resonantes, el ingeniero biomédico Simón Villa Arango desarrolló el diseño de un nuevo sensor de líquidos multicapas basado en cristales fonónicos de cavidad resonante, capaz de detectar los cambios que ocurren al variar las propiedades físicas de un líquido contenido en un elemento descartable. Al finalizar su investigación obtuvo resultados prometedores en el uso de esta tecnología basada en cristales fonónicos para la detección de patógenos y bacterias en aplicaciones biomédicas y en la industria alimentaria (S. Villa-Arango, 2017).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

1.3.2 Marco Teórico

1.3.2.1 Cultivos Bacterianos

Cultivo Celular

Los cultivos de células consisten en un sistema de células extraídas de un órgano o un tejido, normal o enfermo, inmersas en un medio con condiciones químicas, de temperatura, pH, aireación y humedad controladas y específicas de acuerdo a la aplicación. Para que las células sobrevivan y se dé una proliferación sin afectar las funciones de dichas células (Cañada, 2011).

Crecimiento Bacteriano

Es el aumento ordenado de las estructuras y los componentes celulares de un organismo, en este caso de bacterias. Las bacterias se dividen por fisión binaria en la cual una célula madre se divide en dos células hijas genéticamente idénticas, gracias al auto duplicación del material genético hereditario el cual es repartido entre las dos células hijas que luego son separadas para que se dé la formación de la pared celular de cada célula hija. Normalmente el crecimiento de una población está limitado por el agotamiento de nutrientes o por la acumulación de productos del mismo metabolismo microbiano que son tóxicos para la población. Como consecuencia, el crecimiento bacteriano con el tiempo tiende a disminuir hasta detenerse por completo. Así que las etapas del crecimiento bacteriano son la primera o fase de latencia, en el cual las células sintetizan todas las enzimas necesarias para las actividades metabólicas que van a desarrollar, la segunda o fase exponencial las bacterias comienzan con el proceso de división por fisión donde se da un crecimiento exponencial de cada célula en el cultivo, la tercera o fase estacionaria se presenta por el agotamiento del suministro de algún nutriente esencial, la acumulación de productos metabólicos tóxicos, disminución de la oxigenación o cambios del pH que disminuyen la velocidad de crecimiento hasta hacerse nula y por último la fase de muerte donde el número de bacterias que mueren se va haciendo mayor hasta no contar con células nuevas (Benintende & Sanchez, s.f.).

Caracterización del Crecimiento Bacteriano

El crecimiento bacteriano se evalúa haciendo la medición de un parámetro específico sobre la población de interés, que otorgue suficiente información para determinar la cantidad de bacterias en un instante específico. Esta medición debe hacerse sucesivamente en un tiempo determinado para poder tener un control detallado sobre el crecimiento de la población. Existen diversas formas de evaluar el crecimiento en una población bacteriana, donde las más sencillas y utilizadas en los laboratorios clínicos son: Conteo microscópico directo, donde se utiliza un equipo fácilmente disponible en un laboratorio y se cuentan la cantidad de bacterias presentes en un volumen determinado. Otro método simple y muy

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

utilizado es el conteo de células viables, el cual se basa en la consideración de que el crecimiento implica el aumento de los microorganismos capaces de formar colonias, por lo tanto, este método se hace utilizando una placa de conteo con el que se determinan únicamente las células microbianas capaces de proliferar en las condiciones de trabajo. También se puede realizar una medición de la densidad bacteriana donde se mide la masa de los microorganismos en una suspensión, esta técnica utiliza un espectrofotómetro en el que se mide la luz que atraviesa una muestra del paciente, en comparación con una muestra blanco. Cuanto mayor es el número de células en la suspensión, menor será el porcentaje de luz atravesado que luego se puede relacionar con la densidad bacteriana, por medio de ciertas curvas de patrón de densidad conocida. Se puede conocer también el crecimiento bacteriano, midiendo indirectamente la masa de una población observando la proporción de ATP encontrado en una muestra (Benintende & Sanchez, s.f.).

1.3.2.2 Propiedades del Sonido y Cristales Fonónicos

Ondas

Es la propagación de una perturbación en un medio, en la cual se transporta solamente energía, no se transporta materia (Young & Freedman, 2009).

Fenómenos de una Onda

Una onda al ser propagada a través de diferentes medios, puede presentar los siguientes fenómenos:

- Reflexión: se presenta cuando una onda encuentra un cambio de medio, parte de ella no puede atravesarlo así que cambia de dirección.
- Refracción: se modifica la velocidad y dirección de una onda al cambiar de medio.
- Difracción: se presenta cuando una onda rodea un obstáculo.

(Young & Freedman, 2009)

En la Figura 1 se puede ver dichos fenómenos al propagarse una onda cuando pasa por diferentes medios.

A esto se le llama Ley de Snell, la cual indica que cuando un rayo se desplaza de un medio 1 a un medio 2, con índice de refracción n_1 menor al índice de refracción n_2 , el ángulo de salida θ_1 (ángulo de onda refractado) es menor que el ángulo de incidencia θ_2 , respecto a la normal. En el sentido contrario ocurre lo opuesto (Foro Técnico para instaladores de fibra óptica, 2014).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

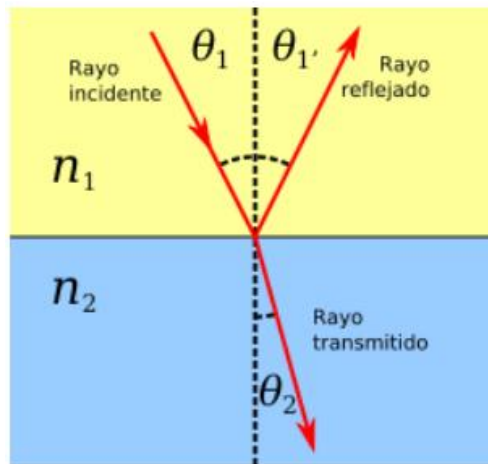


Figura 1. Reflexión y refracción de una onda (TECSUP, 2018)

Ondas Sonoras

Las ondas sonoras son ondas mecánicas longitudinales; mecánicas porque necesitan un medio para propagarse, y longitudinales porque la vibración de sus partículas se da en la misma dirección en la que se propaga la onda (Bautista, 2018). Las ondas sonoras generalmente tienen una velocidad constante, la cual depende del medio donde se propagan y de condiciones ambientales como la temperatura (Miyara, 2000).

Frecuencia

Cuando se tiene una onda sonora periódica quiere decir que se dan muchas perturbaciones sucesivas en el medio, producidas regularmente en un intervalo de tiempo. El número de perturbaciones por segundo es la denominada frecuencia, sus unidades son en número de ciclos por segundos, o Hz (Miyara, 2000).

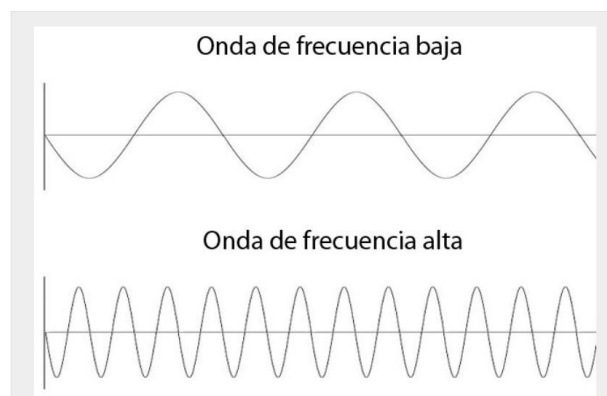


Figura 2. Gráfica de la representación de una onda de alta frecuencia respecto a una onda de baja frecuencia (De La Cruz Reyes, 2016).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

En la Figura 2 se puede observar la diferencia entre una onda con baja y alta frecuencia respectivamente. En el sonido la propiedad que permite distinguir la frecuencia es el tono, entre más agudo suena, mayor frecuencia lleva.

Amplitud

La amplitud de una onda sonora es la intensidad del sonido que se está produciendo, es decir, cuando se sube el volumen se está amplificando dicha onda. “La amplitud de un sonido es el máximo exceso de presión (o presión sonora) en cada ciclo” (Miyara, 2000).

Velocidad

Como se mencionó anteriormente, la velocidad de una onda sonora depende del medio por el cual se está propagando. Para líquidos, gases y sólidos esta se puede encontrar a partir de la densidad del medio y sus propiedades elásticas. En la Figura 3 se puede ver la fórmula para calcular la velocidad del sonido en un medio.

$$v = \sqrt{\frac{\text{propiedad elástica}}{\text{propiedad inercial}}} = \sqrt{\frac{B}{\rho}} \quad \text{donde} \quad \begin{array}{l} B = \text{módulo de bulk} \\ \rho = \text{densidad} \end{array}$$

Figura 3. Ecuación de la Velocidad del Sonido (Rod Nave, Velocidades de Ondas, 2009)

Ultrasonido

Se refiere a ondas sonoras que superan la frecuencia audible para el ser humano, en general con frecuencias mayores a 20KHz (Chandrapala, Oliver, Kentish, & Ashokkumar, 2012).

Coeficiente de transmisión

El coeficiente de transmisión describe la intensidad de una onda transmitida a través de un medio que presenta discontinuidades, con respecto a la onda incidente en este material. Esto sucede debido a que la frecuencia de las ondas incidentes en la superficie del objeto, no coincide con la frecuencia natural del medio. Este puede ser calculado como intensidad de la onda transmitida I_2 , sobre la intensidad de la onda incidente I_1 (Young & Freedman, 2009).

Impedancia Acústica

Es la relación entre la densidad de un medio y su capacidad de transmisión de las ondas de ultrasonido. Es representada con la letra Z. Es el producto de la densidad por la velocidad de propagación del sonido en ese medio (Clínica Universidad de Navarra, 2015).

Cristal fonónico

Un cristal Fonónico (PnC) es un material periódico compuesto, que está constituido principalmente por centros de dispersión con propiedades acústicas diferentes a las de una matriz homogénea que se encuentra alrededor. El diseño de los cristales fonónicos también se puede concebir en estructuras con una reducción en su simetría utilizando una aproximación a una dimensión, las cuales no están formadas por una matriz con unidades de dispersión incrustadas, sino por una serie de capas delgadas consecutivas con impedancias acústicas diferentes y con dimensiones laterales mucho más grandes que su espesor. Las capas están organizadas de forma periódica que permite una modulación espacial de las propiedades acústicas en toda la estructura y facilita la reflexión selectiva de las ondas acústicas y elásticas (Villa-Arango, Betancur Sánchez, Torres, Kyriacou, & Lucklum, 2017).

Esta configuración permite generar un efecto similar a un filtro pasa bandas, donde ciertas bandas de frecuencia no se propagan a través de la estructura, debido a que en el interior del cristal se genera una constante interacción entre las reflexiones y transmisiones de las ondas acústicas, por las múltiples capas que componen el cristal fonónico. La interferencia entre las reflexiones y transmisiones de la onda, pueden ser de forma destructiva y la onda no logra propagarse a través del cristal, o de forma constructiva donde toda la energía de la onda original es transmitida a través de la estructura, actuando así como un tipo de filtro acústico (Villa-Arango, Torres Villa, & Kyriacou, 2016).

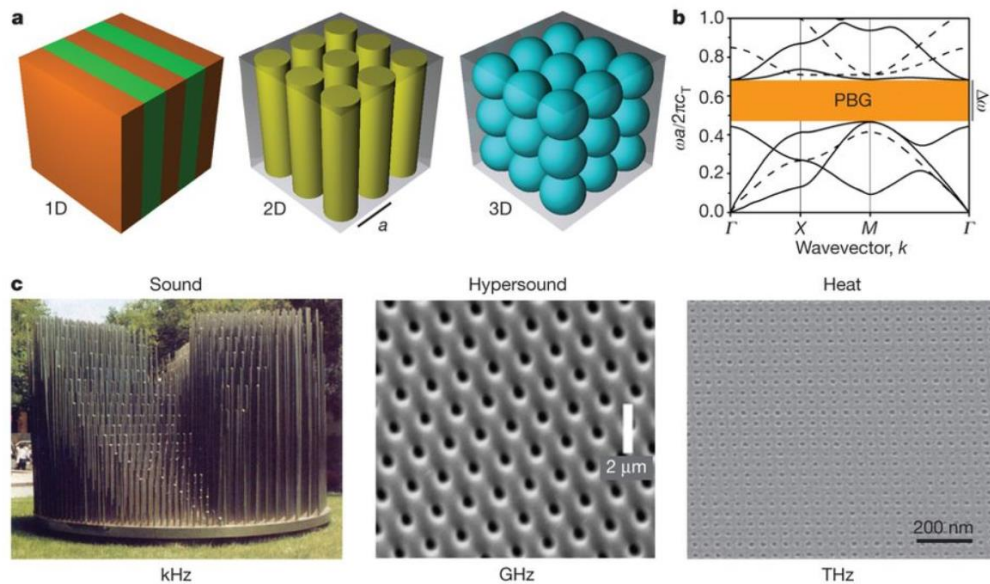


Figura 4. a) Cristales fonónicos de 1D, 2D y 3D, hechos de dos materiales elásticos diferentes y dispuestos periódicamente. b) Ejemplo de la gráfica de la banda

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

rechazada para un cristal fonónico bidimensional, la región PBG representa dicha banda. c) Ejemplos de cristales fonónicos en varias dimensiones, y con diferentes aplicaciones (Maldovan, 2013).

Las estructuras de los cristales fonónicos pueden ser unidimensionales, bidimensionales y tridimensionales. Esto se puede apreciar en la Figura 4. En la Figura 5 se pueden ver diferentes geometrías que pueden presentar los cristales fonónicos tridimensionales.

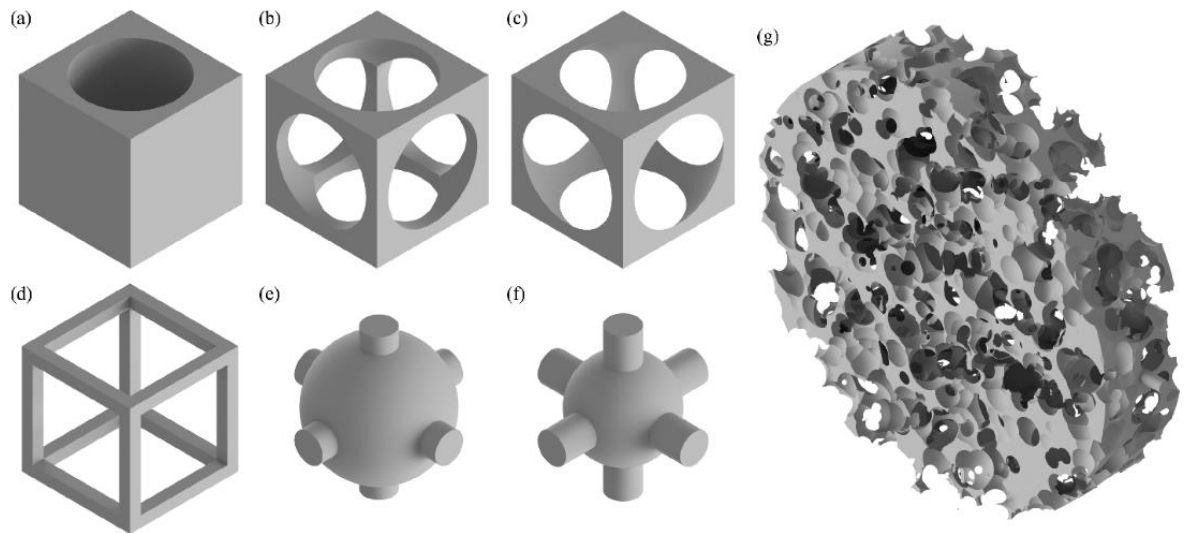


Figura 5. Diferentes geometrías regulares e irregulares de cristales fonónicos en 3D (Lucklum & Vellekoop, 2016).

Los cristales fonónicos en medios líquidos usan una técnica de reducción de simetría que les permite generar características de transmisión específicas para una muestra líquida de interés, lo que puede ser útil a la hora de cuantificar cambios en las propiedades de dichas muestras. Esta técnica de reducción de simetría se basa en la introducción de uno o más modos de defecto hace que la estructura pierda la periodicidad. Este modo de defecto puede ser puntual, de línea o de plano y se inserta de tal manera que se introduzca un modo de resonancia con una frecuencia que se encuentre en el rango de la banda rechazada; está compuesto generalmente por la muestra líquida que se quiere analizar (o analito) lo que significa que la muestra entra a hacer parte de la estructura en sus capas. Lo que sucede es que se genera un pico dentro de la banda rechazada que es característico de la muestra y depende de sus propiedades acústicas, específicamente la velocidad del sonido, que a su vez se relaciona con la masa molar, el volumen molar y la compresibilidad adiabática de la muestra líquida, lo que implica que este tipo de sensor es sensible a las interacciones intermoleculares de los líquidos. Es por esto que los cristales fonónicos como sensores se pueden clasificar como sensores químicos (Villa-Arango, Betancur Sánchez, Torres, Kyriacou, & Lucklum, 2017).

La impedancia acústica efectiva contiene los parámetros acústicos característicos relevantes y el espesor de la capa, e , de cada capa que compone el cristal fonónico. Los coeficientes de transmisión y reflexión se calculan utilizando una impedancia acústica global efectiva de cristal fonónico, Z_L . Es importante aclarar que la impedancia acústica efectiva depende de la frecuencia y es diferente de la impedancia característica del material, Z_c , que es igual a la densidad, ρ , multiplicada por la velocidad del sonido del material, c . El concepto considera la reflexión y la transmisión de ondas en las interfaces de capa y también dentro de cada capa. La impedancia acústica efectiva de la capa i se puede calcular utilizando la Ecuación 1 (Villa-Arango, Betancur Sánchez, Torres, Kyriacou, & Lucklum, 2017).

$$Z_{L(i+1)} = Z_{c(i)} \frac{Z_{L(i)} + jZ_{c(i)}\tan(2\pi fe/c)}{Z_{c(i)} + jZ_{L(i)}\tan(2\pi fe/c)}$$

Ecuación 1. Cálculo de impedancia acústica efectiva para cada capa.

En donde j es la parte imaginaria, e el espesor de la capa actual y c la velocidad de propagación de la onda en esa capa.

Medio de Acople

Cuando una onda pasa de un medio a otro, parte de la onda se transmite y parte se refleja. Este porcentaje de transmisión se da por la diferencia entre impedancias. Cuando entre 2 medios hay una diferencia de impedancias muy grande, la onda no se transmitirá mucho por lo que se necesita un medio de acople que disminuya este cambio y potencie la transmisión de la onda. En el artículo “Coupling Agents in Therapeutic Ultrasound: Acoustic and Thermal Behavior” se obtuvieron resultados en los que “el agua y el gel presentaron el mayor coeficiente de transmisión” (Casarotto, Adamowski, & Fallopa, 2004).

2. METODOLOGÍA

2.1 DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE SOLUCIONES CON PROPIEDADES ACÚSTICAS EQUIVALENTES A LAS DE UN CULTIVO MICROBIOLÓGICO EN MEDIO LÍQUIDO POR MEDIO DE SENSORES FONÓNICOS.

Para poder plantear el protocolo primero se realizó una búsqueda bibliográfica con el propósito de identificar si previamente se habían llevado a cabo experimentos que relacionaran la presencia de bacterias en un cultivo con la velocidad del sonido, que permitieran servir como referencia para el presente proyecto. Se encontraron principalmente ensayos realizados en el espectro del ultrasonido, es decir, ondas de sonido con frecuencias que exceden el límite auditivo del oído humano (mayores a 20 kHz). Las aplicaciones directas de estos ensayos son en la industria alimenticia para el control de bacterias en productos lácteos, más que en cultivos microbiológicos que evalúan la presencia de enfermedades infecciosas en personas. Sin embargo, dicho control no es la única aplicación del ultrasonido en la industria alimenticia, también se usa en productos cárnicos, verduras y frutas, productos de cereales, alimentos aireados, miel, geles alimentarios, proteínas alimentarias, enzimas alimentarias, inactivación microbiana, congelación, secado y extracción, entre otros (T.S. Awad, 2012).

En la búsqueda bibliográfica mencionada se encontraron 4 artículos principalmente, los cuales por medio del ultrasonido evalúan el componente bacteriano de sus respectivos cultivos.

Ultrasonic non invasive techniques for microbiological instrumentation

En este artículo se realizan dos aplicaciones diferentes del ultrasonido basado en el monitoreo del crecimiento microbiológico: un sistema industrial para evaluar la calidad de la leche, el cual es enfocado a evaluar estrategias en la industria alimentaria; y un estudio acerca del crecimiento de *Escherichia Coli* (*E. Coli*) bajo diferentes condiciones. Las mediciones realizadas se hicieron por medio de la técnica de ultrasonido “Pitch-catch”: Una técnica de prueba ultrasónica que implica el uso de dos sondas separadas; una sonda que se usa para transmitir la energía ultrasónica en el cuerpo y la otra que se posiciona para recibir la energía reflejada de una discontinuidad. Para el sistema de control de la leche se ubicaron dos transductores piezoeléctricos cara a cara a cada lado de la muestra que se iba a analizar, la frecuencia de resonancia de dichos transductores fue de 820KHz. Después de viajar a través de los paquetes de leche, las ondas son detectadas por los transductores de recepción. Las señales procedentes de los transductores de recepción se amplifican con un amplificador de 40 dB antes de ser multiplexadas y digitalizadas. La variación del tiempo de vuelo y la amplitud se registraron durante un período de medición establecido (entre 24 y 48 horas). El tiempo de vuelo (TOF) es una propiedad de un objeto, partícula u onda acústica, electromagnética u otra. Es el tiempo que tarda el objeto en recorrer una distancia a través de un medio.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Para el control del crecimiento de E. Coli se realizaron dos experimentos diferentes: cultivos sin presencia de casaminoácidos y con la presencia de este, el cual es típicamente usado en medios de cultivo bacteriano, con sus respectivas comparaciones, es decir, cada experimento lo compararon con espectrofotometría. La conclusión a la que llegaron fue que ambos parámetros son complementarios (el uso de espectrofotometría para medir crecimiento bacteriano y el ultrasonido): mientras que la Densidad Óptica (O.D) está directamente relacionado con la concentración bacteriana, la velocidad del sonido depende de los componentes del medio, lo que está relacionado con la actividad metabólica a través de la disminución de nutrientes y la aparición de algunos productos de metabolismo (L. Elvira, 2010).

Monitoring of Lactic Fermentation Process by Ultrasonic Technique

En este artículo se evalúa el proceso de fermentación láctica en yogur, para monitorear la calidad de este. El medidor de pH es la herramienta experimental más utilizada para determinar el progreso de la fermentación de la leche mediante la medición de la acidez en función del tiempo, debido a la producción de ácido láctico que disminuye el pH de la muestra. Sin embargo, esta técnica requiere la introducción del medidor a la probeta y, por consiguiente, una limpieza constante. Es por esto que ven el ultrasonido como una técnica prometedora para la misma medición de fermentación en yogur pues es no invasiva, no requiere de contacto con la muestra y puede ser en tiempo real. “La evolución de los parámetros ultrasónicos, como la amplitud del eco ultrasónico reflejado en la muestra y la velocidad de propagación del ultrasonido, puede proporcionar información sobre el estado de la leche” (B. Alouache, 2015). De esta manera midieron la velocidad de propagación de la onda ultrasónica, la cual dependía diferencia en la distancia recorrida por la onda ultrasónica en dos muestras de diferentes espesores y el tiempo de vuelo de la onda. Los resultados más significativos que encontraron fue que durante el proceso de fermentación de la leche, el material sufre cambios fisicoquímicos relacionados con el desarrollo de las células bacterianas y un aumento en su concentración. Este cambio en la naturaleza del medio induce un cambio en sus propiedades mecánicas, que se caracteriza por un aumento de su densidad, un ligero aumento de la propagación de la onda de ultrasonido y un aumento no lineal de su coeficiente de atenuación. Esto último conduce a una disminución de la amplitud del eco ultrasónico que emana de la cara posterior de la muestra (B. Alouache, 2015).

Ultrasonic evaluation of UHT milk quality after opening

El objetivo de este estudio se desarrolla mediante la técnica de transmisión ultrasónica para caracterizar y evaluar la calidad de la leche. Para verificar la confiabilidad de esta técnica, se siguió la evolución de los parámetros ultrasónicos a diferentes temperaturas para un paquete de leche esterilizada y un paquete de leche no esterilizada. En este método, se usaron dos transductores idénticos; estos transductores y las muestras se sumergieron en agua dentro de un termostato, los transductores (0,5 MHz como frecuencia central) se montaron cara a cara en los lados opuestos del paquete de leche. En este caso, se midió el tiempo de vuelo con el uso del método de correlación cruzada. El principio de esta técnica es tomar la primera señal transmitida como referencia, luego calcular la función de

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

correlación entre esta señal de referencia y la señal adquirida en cada adquisición hasta el final del experimento. Esta técnica de ultrasonido confirmó que la temperatura de 35°C es la temperatura ideal para el crecimiento bacteriano porque en esa temperatura se encontró actividad bacteriana temprana en comparación con otras temperaturas. De hecho, después de 4 horas, el crecimiento bacteriano comenzó a esta temperatura ya mencionada (E. Ouacha, 2015).

Monitoring of lactic acid fermentation in culture broth using ultrasonic velocity

El objetivo principal de este trabajo fue encontrar una relación entre la propagación de velocidad ultrasónica y los cambios bioquímicos que ocurren durante la fermentación de ácido láctico en medios líquidos. Las mediciones de la velocidad ultrasónica en las mezclas de agua-glucosa, agua-galactosa, agua-lactosa y agua-ácido láctico se utilizaron para comprender los cambios de velocidad ultrasónicos. Se colocaron dos transductores cara a cara en los lados externos del frasco de vidrio y se acoplaron a él con una capa de silicona, una para emitir el pulso ultrasónico y el otro transductor para recibirla después de viajar a través del medio. Las señales se analizaron usando un algoritmo de transformada rápida de Fourier (FFT) para obtener el tiempo de vuelo. Los datos mostraron que a los mismos valores de concentración las velocidades ultrasónicas en las mezclas de carbohidratos crecieron más rápido que en la mezcla de agua y ácido láctico. También encontraron que la velocidad del sonido en las soluciones de glucosa, galactosa y lactosa fue moderadamente diferente. Los cambios en la velocidad del sonido producido por las suspensiones de células de *L. Casei* de concentraciones conocidas se midieron en agua destilada. Los datos mostraron una relación lineal entre el número de bacterias y la velocidad ultrasónica (Resa, Bolumar, Elvira, Pérez, & Montero de Espinosa, 2007).

La

Tabla 1 resume los aportes más importantes de cada uno de los artículos encontrados en la búsqueda bibliográfica. Cada una de las filas enumera los artículos mencionados anteriormente, en la primera columna se encuentra el título del artículo, en la segunda lo que se midió referente a la técnica de ultrasonido y cultivos bacterianos, la tercera columna contiene un resumen de cómo se hicieron dichas mediciones y, por último, en la cuarta columna con qué se comparó cada técnica para validar las mediciones que estaban realizando y fueran acordes con los esperado. La intención de acudir a esta búsqueda bibliográfica no solo fue validar con otras investigaciones que el uso del sonido y las velocidades del sonido sirven para predecir la presencia de microorganismos en diferentes muestras, sino también encontrar valores críticos de dichas velocidades del sonido que sirvieran como referencia para las mediciones posteriores con los sensores fonónicos.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Tabla 1. Resumen de los aportes de los artículos científicos encontrados en la búsqueda bibliográfica para la elaboración del protocolo.

Nombre del Artículo	Qué se quería medir	Cómo lo midieron	Con qué lo compararon
1. Ultrasonic non-invasive techniques for microbiological instrumentation	Crecimiento de E. Coli por medio de cambios en la velocidad del sonido	Técnica Pitch-Catch a 3MHz con presencia y no presencia de Casaminoácidos	Espectrofotometría y Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)
2. Monitoring of Lactic Fermentation Process by Ultrasonic Technique	Fermentación láctica ácida de la leche a partir de la medición del coeficiente de atenuación ultrasónica y la velocidad de propagación del ultrasonido	Transductor ultrasónico plano conectado a un receptor de pulso.	pH
3. Ultrasonic evaluation of UHT milk quality after opening	Tiempo de vuelo a partir de una medida ultrasónica	Dos transductores idénticos, los cuales se sumergieron en agua junto con las muestras, en un termostato	

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

4. Monitoring of lactic acid fermentation in culture broth using ultrasonic velocity	Relación entre la velocidad ultrasónica y el catabolismo bacteriano	Dos transductores cara a cara en los lados externos del frasco de vidrio y se acoplaron a él con una capa de silicona, uno para emitir el pulso ultrasónico y el otro transductor para recibirlo después de viajar a través del medio	pH
--	---	---	----

Los resultados del primer artículo científico de la

Tabla 1 permitieron identificar las variaciones de la velocidad del sonido que presenta un cultivo a lo largo del tiempo y en qué momentos del crecimiento bacteriano se dieron las máximas y las mínimas variaciones, lo cual es clave a la hora de plantear el protocolo pues ya sabiendo los valores de la velocidad del sonido en un cultivo bacteriano y cuánto varían estos, se pueden calcular las concentraciones de solución salina que debe tener la solución equivalente para poder probar la viabilidad del sensor fonónico y la sensibilidad de este ante las variaciones planteadas.

El segundo artículo científico provee información propiamente de los valores de velocidad del sonido a raíz de la fermentación láctica que se da en la leche y los productos lácteos por la presencia y el crecimiento de bacterias, en función del tiempo. Para esto contaron con un Transductor ultrasónico plano conectado a un receptor de pulso, la adquisición de la señal se dio por medio de un osciloscopio digital y después se calculó la velocidad de la onda ultrasónica. Estos valores de velocidad son los que permiten establecer los máximos y los mínimos valores de velocidad del sonido que debe registrar el sensor fonónico con las soluciones equivalentes. Asimismo, los resultados del último artículo científico indican cambios en la velocidad del sonido producido por suspensiones de células de *L. Casei* de concentraciones conocidas medidas en agua destilada, lo que significa una medida cuantitativa de la afluencia de células bacterianas en un cultivo microbiológico. En este se transmitía una ráfaga de pulso o tono a una frecuencia de 2 MHz, luego se recibían y analizaban los ecos recibidos o las señales de transmisión pasante.

En los resultados de los artículos anteriores se puede observar que el uso de la velocidad del sonido es clave para obtener información acerca de presencia de microorganismos infecciones en cultivos. Las velocidades del sonido encontradas en los cultivos de los

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

artículos varían entre 1535 m/s y 1548 m/s aproximadamente, lo cual indica que un sensor para determinar estas variaciones debería ser capaz de medir en este rango de variaciones.

Los diferentes cultivos cuentan con propiedades diferentes en cuanto al componente biológico que está creciendo en el cultivo, esto hace que no sea homogénea la medición en todos los artículos.

En este trabajo de grado, se utilizó una solución equivalente que permite verificar si el sensor fonónico puede hacer mediciones en ese rango de velocidades del sonido. La solución equivalente tiene esas velocidades del sonido, y presenta características similares a las del cultivo. Se decidió utilizar la solución salina por este motivo y se incluyó dentro del protocolo, pues en previas investigaciones se ha usado la solución salina y ha demostrado ser versátil en el uso de los cristales fonónicos (Villa-Arango, Torres Villa, & Kyriacou, 2016).

Los rangos máximos y mínimos de velocidad del sonido a utilizar en las soluciones equivalentes se definieron teniendo en cuenta los resultados del segundo artículo en la revisión bibliográfica.

En la Figura 6 se puede observar los resultados de las investigaciones realizadas por L. Elvira et al. En el eje Y (izquierda) la variación en la velocidad del sonido de los dos tipos de muestras que se tomaron, tanto de cultivos sin la presencia de casaminoácidos y con la presencia de ellos, aminoácidos comúnmente usados en medios de cultivos bacterianos. En el eje Y (derecha) se puede observar la Densidad Óptica de las mismas dos muestras a modo de comparación con las mediciones de velocidad del sonido. El eje X es el tiempo transcurrido. El análisis de los autores se resume en las siguientes premisas

- No se registró ningún incremento de O.D durante las primeras cinco horas.
- La velocidad del sonido es constante durante las primeras 7-8 horas, después de lo cual comienza un decrecimiento lento para el comienzo de la etapa exponencial.
- Cuando se agregaron casaminoácidos al medio, la etapa de latencia se acorta. La D.O (cuadrados) muestra un incremento lento durante las primeras horas y después de la noche alcanzan una constante, que es la etapa constante.
- Las mediciones de velocidad del sonido ultrasónico también muestran una disminución rápida desde la hora 4, alcanzando la estabilidad después de la hora 20.
- Esta disminución de la velocidad del sonido está relacionada con el consumo de glucosa.

(L. Elvira, 2010)

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

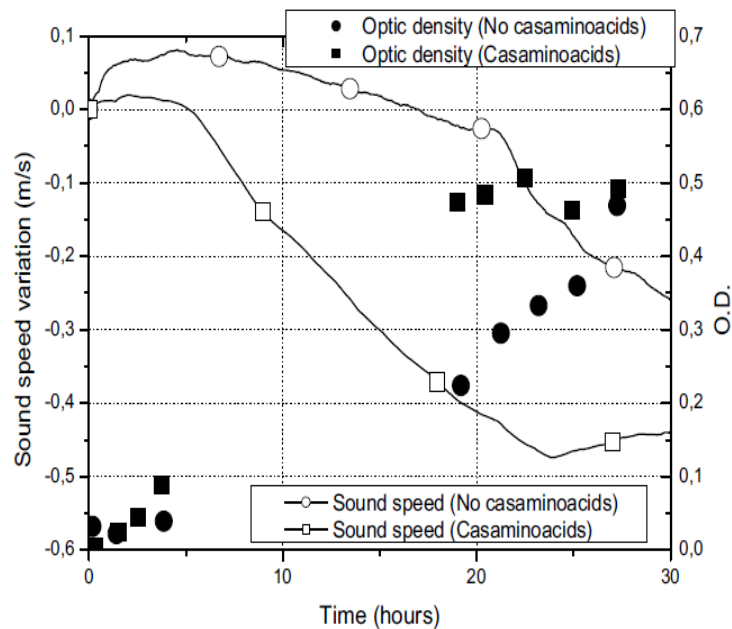


Figura 6. Resultados más significativos del Artículo 1 encontrado en la búsqueda bibliográfica como referencia para la elaboración del protocolo (L. Elvira, 2010).

En la Figura 7 se puede observar los resultados de las investigaciones realizadas por B. Alouache et al. El eje X es el tiempo que va transcurriendo, el eje Y muestra la variación de la velocidad ultrasónica durante la fermentación láctica de la leche, denotada en m/s. Al final de las mediciones se encontró que hubo un aumento en la velocidad de 8m/s. El cambio en la naturaleza de la muestra induce un cambio en las propiedades mecánicas de la misma, lo cual es caracterizado principalmente por un aumento en su densidad (B. Alouache, 2015).

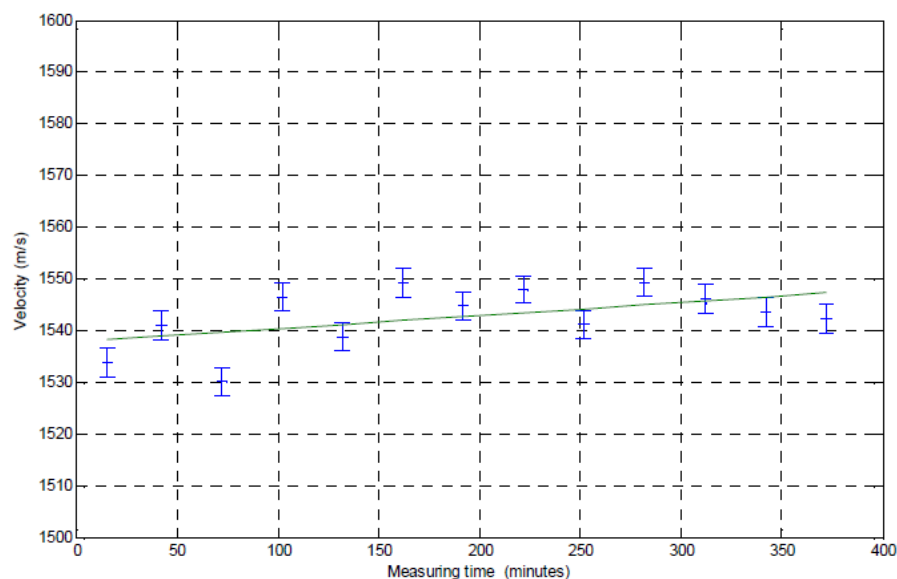


Figura 7. Resultados más significativos del Artículo 2 encontrado en la búsqueda bibliográfica como referencia para la elaboración del protocolo (B. Alouache, 2015).

En la Figura 8 se puede observar los resultados de las investigaciones realizadas por Resa et al. Durante la fermentación bacteriana, adicional al consumo de nutrientes y a los cambios fisicoquímicos, el número de bacterias aumenta. El eje X muestra el crecimiento de dichas células bacterianas, mientras que en el eje Y se encuentra la velocidad del sonido para determinadas concentraciones de bacterias, en agua destilada. Durante los experimentos, las concentraciones celulares alcanzan cifras entre 10^9 y 10^{10} células/mL (Resa, Bolumar, Elvira, Pérez, & Montero de Espinosa, 2007).

Se puede entender que, de acuerdo a los artículos encontrados en la revisión bibliográfica, todos llegan a una misma conclusión: un cambio en las propiedades de una muestra debido a un aumento en la concentración de productos metabólicos causados por un aumento de bacterias en el medio, genera un cambio en la velocidad del sonido de dicha muestra, el cual puede ser cuantificado por medio de técnicas de ultrasonido.

De acuerdo a las investigaciones que se dieron en los artículos presentados como parte de la revisión bibliográfica presenta que los cultivos microbiológicos cuentan con velocidades del sonido alrededor de los 1500 metros por segundo.

Los resultados obtenidos por diferentes autores en múltiples ensayos experimentales muestran que la velocidad del sonido de los cultivos microbiológicos es cercana a la velocidad del sonido del agua destilada. Sin embargo, la velocidad del sonido del agua destilada siempre será constante pues no hay un cambio en sus componentes a medida que transcurre el tiempo. Por otro lado, para el caso de la velocidad del sonido en cultivos microbiológicos, a medida que aumenta el tiempo y dichos microorganismos se empiezan

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

a proliferar, se van generando cambios en la velocidad del sonido. Esto podría presentarse porque los residuos metabólicos y el crecimiento de los microorganismos genera este cambio.

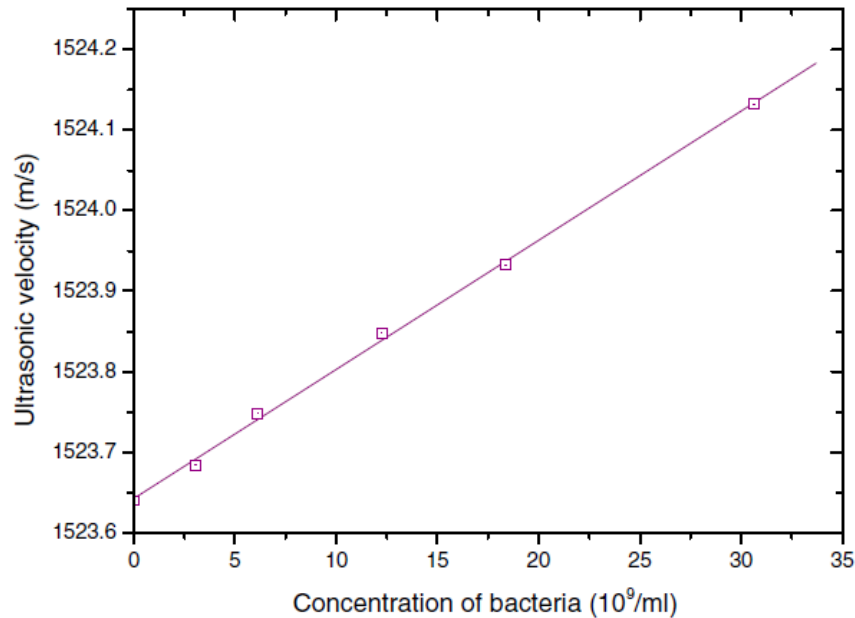


Figura 8. Resultados más significativos del Artículo 4 encontrado en la búsqueda bibliográfica como referencia para la elaboración del protocolo (Resa, Bolumar, Elvira, Pérez, & Montero de Espinosa, 2007).

Los cristales fonónicos usados como sensores son una tecnología en desarrollo, que ha mostrado mucho potencial y aún no ha sido trabajada por muchos autores, pero presenta mucho interés en el ámbito científico. Entre ellos se encuentra Lucklum et al, y Villa-Arango et al. Los sensores fonónicos utilizados por estos autores demostraron ser útiles para realizar mediciones en muestras líquidas con transductores de ultrasonido con frecuencias de trabajo en el orden de MHz y dimensiones macroscópicas en el orden de milímetros.

Estos sensores fonónicos permiten realizar mediciones en muestras con velocidades del sonido entre 1000 y 1700 m/s lo cual hace viable la exploración de su uso como sensores para evaluar el crecimiento en cultivos microbiológicos.

Para evaluar el comportamiento del sensor y si puede ser utilizado para estas aplicaciones se utilizó una solución equivalente, la cual cuenta con características similares a las de un cultivo microbiológico en el sentido que la velocidad del sonido es similar y permite analizar el rango de velocidades establecido. Estas soluciones requieren tener una velocidad del sonido en el rango de 1535 m/s y 1548 m/s. Pruebas experimentales preliminares han demostrado que se pueden realizar soluciones equivalentes que tengan la misma velocidad del sonido que los diferentes momentos clave de crecimiento del cultivo microbiológico. Por

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

esta razón se definió utilizar solución salina cambiando su concentración para cambiar la velocidad del sonido a medida que se simula un mayor crecimiento de un cultivo microbiológico.

Una vez identificados los valores de velocidad del sonido que se deben adquirir por parte del sensor y las variaciones de este, se calcularon las concentraciones de solución salina de la solución equivalente.

Kleis et al. describe la velocidad del sonido de una solución salina en términos de la temperatura de la solución en grados Celsius y la salinidad como porcentaje de sal, como una función lineal de salinidad para un rango de temperaturas entre 7° y 88°C (S. J. Kleis, 1990).

La velocidad en m/s se puede ver en la Ecuación 2, donde esta depende de dos funciones a_0 y a_1 dependientes de la temperatura, la cual se considera la temperatura ambiente, es decir 22°C.

$$S(c, T) = a_0(T) + a_1(T)c$$

$$a_0(T) = -101,682 - 0,857118T - 0,0237298T^2 + 0,000453213T^3 - 2,17401 \times 10^{-6}T^4$$

$$a_1(T) = 0,0722597 + 0,000412596T + 1,46562 \times 10^{-5}T^2 - 2,65803 \times 10^{-7}T^3 + 1,27778 \times 10^{-9}T^4$$

Ecuación 2. Función lineal de Salinidad a partir de la velocidad del sonido (S. J. Kleis, 1990).

Los valores de velocidad del sonido que debe detectar el sensor fonónico se escogieron de acuerdo a los resultados encontrados en la búsqueda bibliográfica, donde el mínimo valor es de 1535 m/s y el máximo de 1548 m/s. En la Tabla 2 se puede apreciar cuánto debe ser el porcentaje de salinidad para cada uno de los valores de velocidad del sonido, aplicando la ecuación de Kleis et al.

Tabla 2. Porcentaje de Salinidad que deben tener las soluciones equivalentes de acuerdo con la Ecuación 2.

Velocidad del Sonido (m/s)	Porcentaje de Salinidad (%)
----------------------------	-----------------------------

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

1535	4,148
1541	4,664
1545,3	5,033
1548	5,265

El sensor fonónico que se utilizó es un sensor fonónico de 9 capas, las cuales se componen de capas intercaladas entre agua y vidrio, y en el medio la cavidad resonante donde se introdujo el analito que se analizó.

La selección de los materiales de las capas (agua y vidrio) se realizó debido al radio de impedancias que estos materiales presentan, el cual es alto y permite una adecuada reflexión de ondas como para generar bandas rechazadas.

El vidrio fue seleccionado como material debido a que es un material ampliamente utilizado en pruebas de laboratorio y en aplicaciones biomédicas, y permite mantener la muestra sin modificar al realizar las mediciones.

La capa del medio es la capa que genera el modo de defecto, este modo de defecto se diseñó utilizando la técnica de reducción de simetría que consiste en insertar una alteración en una estructura simétrica. En este caso se duplicaron las dimensiones de la capa central. Al hacer esto se habilita la aparición de un modo de defecto con una frecuencia que está en el medio de la banda rechazada.

El modo de defecto se manifiesta en el centro de la banda rechazada como un máximo de transmisión. Este máximo se desplaza hacia más bajas o altas frecuencias según sea la velocidad del sonido de la muestra, lo cual lo hace ideal para caracterizar este tipo de aplicaciones en las cuales se busca medir cambios en las propiedades acústicas de un analito, en este caso un cultivo en crecimiento con rangos de velocidad del sonido entre 1535 m/s y 1548 m/s.

Se espera que estos cambios de velocidad generen un desplazamiento del pico de interés hacia frecuencias más altas.

Las propiedades de velocidad del sonido de los materiales y las dimensiones de las capas se pueden ver en la Tabla 3.

Tabla 3. Propiedades y dimensiones de las capas del cristal fonónico que se usó.

Capa #	Espesor (mm)	Material	Densidad (Kg/m ³)	Velocidad del sonido (m/s)
1	-	PZT	3333	7500
2	1	Vidrio	2200	1483
3	0.5	Agua	998	5720
4	1	Vidrio	2200	1483

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

6	1	ANALITO		
5	1	Vidrio	2200	5720
7	0.5	Agua	998	1483
8	1	Vidrio	2200	5720
9	-	PZT	3333	7500

En la Tabla 3 no se especifican las propiedades del analito debido a que estas cambian dependiendo de la concentración de solución salina que tenga la muestra, y esto finalmente es lo que se quiere encontrar con el sensor fonónico.

Para realizar la evaluación del cristal fonónico como sensor para analizar cultivos microbiológicos se desarrolló un protocolo, el protocolo tiene en cuenta las características de la solución, la utilización del sensor fonónico y la implementación de un esquema limpio de la cavidad resonante a medida que se introduce una nueva solución que se va a medir.

El protocolo se describe a continuación:

1. Realizar un lavado cuidadoso con agua destilada de la cavidad donde se ubica la muestra en el sensor fonónico.
2. Secar la cavidad donde se ubica la muestra en el sensor fonónico.
3. Introducir agua destilada para una realizar una primera medición que permita la calibración del sensor.
4. Verificar que la temperatura de la muestra sea de 22°C para que la medida no se vea afectada por cambios en la temperatura.
5. Introducir el agua destilada en la cavidad donde se ubica la muestra en el sensor fonónico para realizar la medición de referencia.
6. Preparar las 9 soluciones salinas diferentes variando las concentraciones de acuerdo a la fórmula anterior.
7. Introducir la primera solución al sistema y tomar 3 medidas diferentes verificando que la temperatura sea de 22°C, repetir con cada una de las diferentes soluciones con concentraciones diferentes y realizando un lavado de la cavidad previo a cada prueba.

MONTAJE EXPERIMENTAL:

El ensayo experimental para evaluar el funcionamiento del sensor fonónico debió incluir adicional al cristal fonónico y a las muestras, un par de transductores ultrasónicos, estos transductores estaban conectados a un analizador de espectros, el cual permite generar y obtener las ondas que se van a pasar a través del cristal. Los transductores ultrasónicos

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

son transductores piezoeléctricos que permiten transformar las señales eléctricas en ondas mecánicas y así excitar el cristal fonónico para obtener su respuesta en frecuencia.

Se utilizó el analizador de espectros RIGOL DSA815 del laboratorio de bioinstrumentación de la Universidad EIA, se puede ver en la Figura 9. Este analizador cuenta con una función de análisis de transmisión en un barrido de frecuencias que permite obtener la respuesta en frecuencia de un sistema.



Figura 9. Analizador de Espectros RIGOL DSA815

Al analizador de espectros se conectó un par de transductores ultrasónicos de ondas longitudinales V103-RB de Olympus. Estos transductores de contacto permiten excitar el sensor fonónico y transformar las señales eléctricas en ondas mecánicas y viceversa. El montaje realizado de este complejo analizador de espectros, transductores y cristal fonónico se puede ver en la Figura 10.

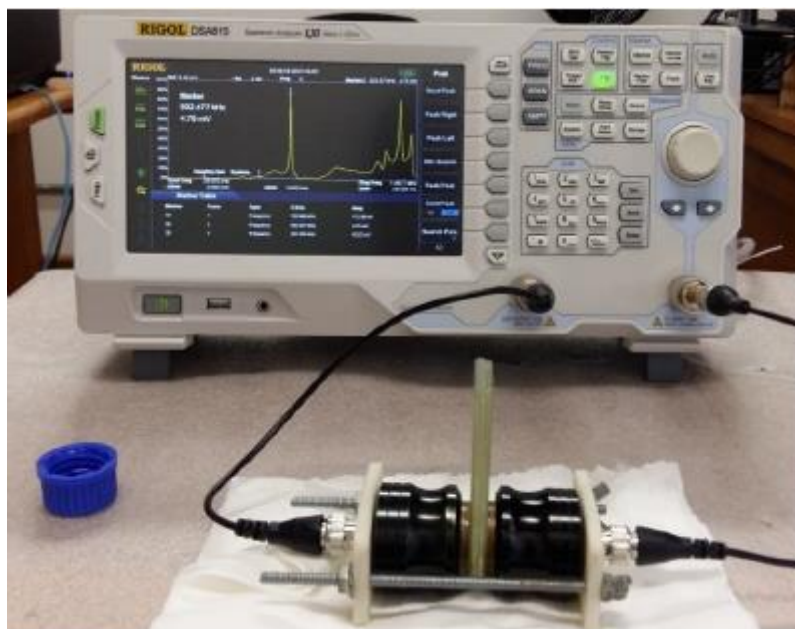


Figura 10. Cristal fonónico en el centro de los transductores, que a su vez están conectados al analizador de espectros.

2.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

2.2.1 Solución Salina

Una vez se tuvo el protocolo planteado, junto con los porcentajes de salinidad que se debían preparar en las soluciones salinas se procedió a preparar dichas muestras.

El sensor fonónico utilizado tiene una cavidad resonante con un volumen útil de 0.1 mL, este volumen es ideal para pruebas cerca al paciente o para aplicaciones en las cuales el consumo de analito sea crítico. Sin embargo, para realizar las concentraciones se utilizaron concentraciones de mayor volumen para facilitar la preparación de dichas muestras y poder disminuir el error pues las cantidades de NaCl debían ser muy exactas, es decir, lo más cercano posible a los valores teóricos.

Como el cambio de porcentaje de salinidad entre muestras debe ser muy pequeño se prepararon soluciones de 10 mL para cada uno de los porcentajes planteados.

Para calcular cuánta masa de NaCl se debía adicionar a la solución se usa la fórmula de Porcentaje Peso a Peso, de la Ecuación 3. Al despejar la masa del soluto, que en este caso es NaCl se obtiene la Ecuación 4.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

$$\%masa\ del\ soluto = \frac{masa\ (g)\ de\ soluto}{masa\ (g)\ solución} * 100\%$$

Ecuación 3. Fórmula de Porcentaje Peso a Peso para calcular la masa de NaCl para las diferentes concentraciones de Solución Salina.

$$masa\ (g)\ de\ soluto = \frac{\%masa\ del\ soluto * masa\ (g)\ solución}{100\%}$$

Ecuación 4. Masa del Solute despejado, a partir de la Ecuación 3.

Como la densidad del agua es 1g/mL, para 10 mL de solución la masa equivale a 10 g.

En la Tabla 4 se puede apreciar los cálculos realizados para la cantidad de NaCl que se debe adicionar para una solución de 10mL, para cada una de las concentraciones planteadas.

Tabla 4. Cálculo de masa de NaCl para cada una de las soluciones planteadas

Porcentaje de Salinidad (%)	Masa de NaCl (mg)
4,148	414,8
4,664	466,4
5,033	503,3
5,265	526,5

Una vez preparadas y rotuladas las soluciones se procedió a tomar las mediciones siguiendo el protocolo planteado.

2.2.2 Comparación con otras técnicas convencionales (Uso de Glicerol)

Como parte de la evaluación del sensor fonónico y su implementación en aplicaciones para pruebas líquidas, se decidió comparar los resultados para caracterizar fluidos entre el cristal fonónico y uno de los sensores resonantes más importantes en la actualidad, que es la Microbalanza de Cuarzo.

La Microbalanza de Cuarzo se diferencia del cristal fonónico en el sentido que el cristal fonónico realiza una interrogación volumétrica del fluido, mientras que la Microbalanza solo de la superficie. Sensores como el de la Microbalanza se han utilizado ampliamente en aplicaciones como biosensores para detectar la presencia de microorganismos y han sido los más competitivos hasta el momento (Montagut, y otros, 2011).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Para esta evaluación se realizó la caracterización del glicerol, el cual nos permite tener una amplia variación de la velocidad del sonido y tiene características biológicas, es decir, está presente en las células tanto vegetales como animales formando parte de las membranas en la bicapa fosfolipídica, quien es el que hace el puente entre los ácidos grasos y los componentes hidrofílicos (Universidad de Vigo, Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, 2018). Su fórmula química es $C_3H_8O_3$, su nombre químico es 1,2,3-triol propano (Instituto Nacional de Ecología Y Cambio Climático), es un alcohol que posee tres grupos hidroxilos, conocido comercialmente como glicerina. Es un compuesto líquido a temperatura ambiente, viscoso, incoloro e inodoro, de fácil solubilidad en agua y alcoholes por sus grupos hidroxilos (-OH) (Lafuente Aranda, 2017).

Se decidió utilizar el glicerol ya que se cuenta con datos en la bibliografía de la respuesta en frecuencia y de la velocidad del sonido del glicerol. Debido a sus propiedades de solubilidad en agua, con alta densidad y viscosidad se ha venido usando como potencial compuesto para simular las condiciones de la sangre y probar sensores para PoCT. Investigadores de la Universidad EIA están haciendo uso de Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) para detectar cambios en la concentración de dicho glicerol (Montagut, y otros, 2011).

El principio de funcionamiento de los QCM es un sensor gravimétrico que cambia la frecuencia de oscilación de un cristal piezoeléctrico en función de la masa depositada sobre su superficie. Los QCM tienen frecuencias de trabajo de alrededor de 10 MHz; sin embargo, para aumentar su sensibilidad, los investigadores han propuesto el uso de frecuencias más altas, lo que trae consigo complejidades para desarrollar sistemas de caracterización electrónica debido a la introducción de capacidades parásitas y corrientes. (Montagut, y otros, 2011). Debido a la anterior se propuso el uso de sensores fonónicos buscando comparar las dos tecnologías con la misma finalidad.

Se prepararon 9 soluciones de glicerol a diferentes concentraciones con agua destilada, partiendo de 1% hasta 99%, diluyendo un frasco de glicerol que se encontraba al 99%. Para calcular cuánto volumen de agua destilada se debía adicionar a la solución se usó la fórmula de Porcentaje Volumen a Volumen, de la Ecuación 5. Al despejar el volumen del soluto, este caso el Glicerol se obtiene la Ecuación 6.

$$\%volumen\ del\ soluto = \frac{volumen\ (mL)\ soluto}{volumen\ (mL)\ solución} * 100\%$$

Ecuación 5. Fórmula de Porcentaje Volumen a Volumen para encontrar la cantidad de Glicerol que se debía agregar al agua destilada para las diferentes concentraciones.

$$volumen\ del\ soluto = \frac{\%volumen\ del\ soluto * volumen\ (mL)\ solución}{100\%}$$

Ecuación 6. Volumen del Solute despejado, a partir de la Ecuación 5.

Por último, para encontrar cuánto disolvente se debía adicionar se usa la Ecuación 7.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

$$\text{volumen solvente} = \text{volumen solución} - \text{volumen soluto}$$

Ecuación 7. Cálculo para encontrar el Volumen del Solvente, teniendo en cuenta cuánto volumen de solución de desea y cuánto soluto se calculó.

Para las concentraciones menores de glicerol los volúmenes de solución que se prepararon fueron mayores debido a la dificultad que presentaba extraer una poca cantidad de glicerol, así que para las concentraciones de 1%, 7.5% y 15% se preparó 10mL de solución para cada una, y a medida que iba aumentando la concentración de glicerol se podía disminuir el volumen final de solución para no desperdiciar glicerol innecesariamente. Por consiguiente, para concentraciones de 30% y 45% los volúmenes de la solución fueron de 5mL. Por último, para las concentraciones de 60%, 75% y 90% los volúmenes de la solución fueron de 2mL. En la Tabla 5 se puede apreciar los cálculos realizados para la cantidad de glicerol que se debe adicionar a las soluciones, para cada una de las concentraciones planteadas.

Tabla 5. Cálculo de volumen de Glicerol y Agua Destilada para cada una de las soluciones planteadas

Concentraciones de Glicerol (%)	Volumen de Solvente (mL)	Volumen de Solute (mL)	Volumen de Solución (mL)
1	9,95	0,05	10
7,5	9,25	0,75	10
15	8,5	1,5	10
30	3,5	1,5	5
45	2,75	2,25	5
60	0,8	1,2	2
75	0,5	1,5	2
90	0,2	1,8	2

En cuanto a la preparación del 99% de concentración, como el frasco que se compró venía con dicha concentración no fue necesario preparar una solución, así que se usó directamente en el sensor fonónico la cantidad necesaria del frasco de glicerol.

2.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIACIONES EN LAS PROPIEDADES ACÚSTICAS DE LAS SOLUCIONES EQUIVALENTES CON UN SENSOR FONÓNICO.

Los sensores fonónicos como se había enunciado inicialmente, son estructuras que poseen una modulación periódica y espacial de sus propiedades acústicas, lo que les permite tener control sobre la transmisión selectiva de ondas elásticas mecánicas en sólidos y ondas de acústicas en líquidos. Si bien se había indicado su definición, no se había especificado el

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

tipo de sensor fonónico que se iba a usar para las mediciones. En la Figura 11 se muestra el tipo de sensor que se utilizó en este proyecto. Este consta de un solo modo de defecto el cual tiene capas intercaladas de agua y vidrio, y finalmente en el centro el modo de defecto destinado para el analito, en este caso la muestra de solución salina de concentración conocida. En la Figura 12 se puede ver la respuesta en frecuencia de este tipo de sensor que se utilizó para este trabajo de grado.

Adicional a las capas de vidrio y agua que hacen parte la estructura periódica del sensor fonónico, se hace necesario un medio de acople entre los vidrios de los extremos y el generador de la onda ultrasónica, pues debido al cambio de medio será mayor la porción de onda reflejada cuando la densidad del medio incidido es mucho mayor a la del medio incidente. Es por esta razón que se optó por el uso del glicerol, pues este tiene una densidad menor a la del vidrio lo que hace que sea mayor la onda incidente que la reflejada por un cambio de medio. Cuando se integra el glicerol en la estructura este se vuelve parte del sistema como una nueva “capa” el cual influye en la respuesta final del sistema.

Mediciones

Para tomar las mediciones se siguieron los pasos planteados en el protocolo. Cada vez que se iba a adicionar una nueva muestra con concentración de solución salina diferente se debía lavar por tres veces con agua destilada la cavidad resonante del sensor. Y cuando se adicionaba la nueva muestra se esperaba aproximadamente 1 minuto para que el sistema se estabilizara y se pudiera guardar el dato del pico máximo con su mayor amplitud.

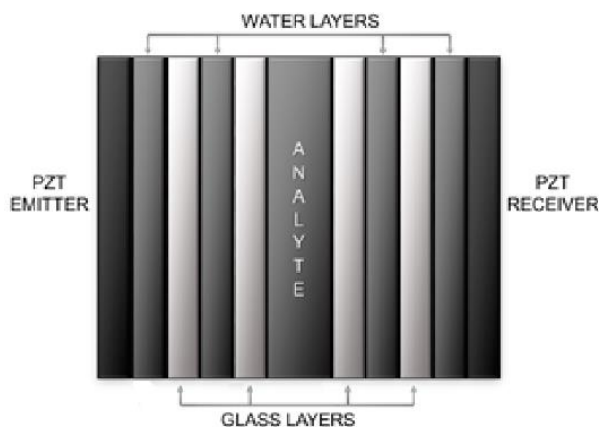


Figura 11. Estructura del Sensor Fonónico usado en el trabajo de grado (Villa-Arango, Betancur Sánchez, Torres, Kyriacou, & Lucklum, 2017). Sensor fonónico con un solo modo de defecto.

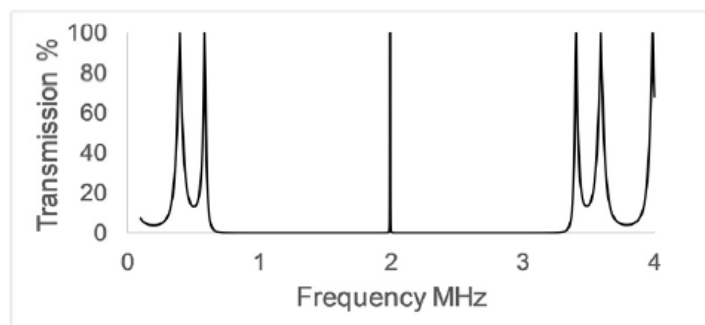


Figura 12. Respuesta en frecuencia del Sensor que se usó (Villa-Arango, Betancur Sánchez, Torres, Kyriacou, & Lucklum, 2017).

Una vez se obtuvieron los datos se procedió a su análisis y procesamiento por medio de la herramienta MATLAB. En primer lugar, los datos obtenidos por el osciloscopio se debieron cambiar su formato pues si se pasaban directamente a MATLAB no se podían leer, pues el formato que entrega el analizador de espectros son valores separados por comas (CSV) que no son fáciles de observar por medio de MATLAB, así que se hizo necesaria una herramienta creada por investigadores de la Universidad EIA para dicho fin. Ya teniendo los datos descomprimidos, en el software de procesamiento de señales, MATLAB, se procedió a una interpolación para que al momento de graficar las señales se puedan ver más suavizadas, es por la misma razón que realizó un filtro de media móvil.

2.4 EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LOS SENSORES FONÓNICOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS, COMPARANDO LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LOS DE UNA TECNOLOGÍA EXISTENTE.

Como parte de la evaluación y utilización del cristal fonónico para aplicaciones en las cuales se detecten componentes biológicos, se decidió realizar pruebas en las cuales se otorgara una especificidad adicional al sensor por medio de una reacción antígeno-anticuerpo.

Como se ha mencionado anteriormente, cuando se analiza una muestra con un sensor fonónico lo que se está midiendo directamente es la velocidad del sonido de esa muestra en particular. Esto representa un desafío a la hora de medir componentes específicos en la muestra, pues la composición de esta se puede ver afectada por presencia de otras sustancias, que en últimas cambia la velocidad del sonido de todo el complejo. Es por esto que se plantea el uso de sensores fonónicos con sus cavidades resonantes funcionalizadas, es decir, inmovilización de proteínas en la cavidad donde se insertan las muestras a medir, cuando una molécula diana está presente en la muestra, se adhiere al agente de reconocimiento biológico en las paredes de la cavidad generando una capa delgada adicional a la estructura del sensor fonónico, modificando su respuesta de frecuencia y haciéndola específicamente sensible a esa molécula objetivo. De esta manera por medio de la medición de velocidad del sonido se puede identificar la presencia de una molécula

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

específica en una muestra. A través de la funcionalización de la cavidad resonante con un agente de reconocimiento, se pueden realizar mediciones selectivas y utilizarse en aplicaciones como las pruebas PoCT para detectar proteínas y biomarcadores específicos.

El BSA (Bovine Serum Albumin) es una proteína transportadora extracelular, que se expresa en diferentes estructuras tales como el endometrio, leucocitos, neutrófilos, plasma, entre otros (Biocompare, 2018). La funcionalización de la cavidad resonante se dio en las paredes de vidrio del sensor fonónico con la inmovilización de anticuerpos BSA. Se realizaron muestras a diferentes concentraciones del BSA en solución amortiguadora o buffer PBS. Cuando el antígeno se une al anticuerpo dentro del sensor fonónico, este queda adherido a las paredes lo que hace que se dé un cambio en la respuesta en frecuencia trasladando el pico de máxima amplitud, reportando así la presencia de dicha proteína en la muestra.

El proceso de inmovilización se realizó mediante un protocolo similar al propuesto por Nagel et al, donde una proteína de 38 kDa de Mycobacterium tuberculosis se inmovilizó sobre una superficie de vidrio. Este protocolo se seleccionó para inmovilizar el antígeno BSA en las paredes de vidrio de la cavidad porque el antígeno utilizado en el estudio presentado por Nagel et al. comparte grupos amino similares con el antígeno BSA. La superficie de vidrio de las paredes de la cavidad resonante se modificó con un procedimiento de silanización que utiliza una solución de piraña y APTES, (3-Aminopropil) trietoxisilano para cubrir las paredes con moléculas de alcoxisilano órganofuncionales. A continuación, se utilizó el reticulador PDITC, p-fenileno diisotiocianato, para unir la superficie con los grupos amina del antígeno BSA. Además de los pasos representados en el protocolo al que se hace referencia, se usó etanolamina al 10% (v/v) para saturar los sitios de unión no ocupados como un reactivo de bloqueo que evita una participación activa de estos sitios de unión en la reacción de ensayo específica (Nagel, y otros, 2008). Cuando el anticuerpo diana está presente en la muestra, se adhiere al agente de biorreconocimiento en las paredes de la cavidad, en este caso, el antígeno, y genera una capa delgada adicional a la estructura del sensor de cristal fonónico, modificando su respuesta de frecuencia y haciendo el sensor fonónico capaz de detectar moléculas específicas.

Se realizó una prueba experimental para evaluar el rendimiento del biosensor de cristal fonónico al agregar el anticuerpo respectivo (Anti-BSA) diluido en la solución amortiguadora PBS en diferentes concentraciones (5 ug/mL, 0.5 ug/mL, 0.05 ug/mL, 0.005 ug/mL y 0,0005 ug/mL) en la cavidad resonante. Todos los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente, a aproximadamente 25 °C. La temperatura se mantuvo constante usando control de temperatura ambiente. El protocolo utilizado para las pruebas fue el siguiente. Una vez se tenían las concentraciones de BSA que se iban a introducir a la cavidad resonante del sensor fonónico, se aplicó HCl a una concentración de 0.1 M por 3 minutos para limpiar y romper los enlaces anteriores, posteriormente se retiró el HCl y se lavó con la solución amortiguadora PBS por cinco veces. Para obtener la línea base como comparación se introdujo 45uL de la solución amortiguadora PBS y se midió la respuesta en frecuencia del sensor fonónico, se agregó solución deseada de anticuerpo-PBS teniendo en cuenta que se diluiría con la solución amortiguadora PBS ya introducida. Se realizaron mediciones cada 5 minutos, por un total de 20 minutos. Se retiró la solución y se lavó la cavidad resonante

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

con PBS 5 veces. Se introdujo 90 uL de PBS y se midió la respuesta en frecuencia del sensor fonónico. Esta medida corresponde al control y está diseñada para evidenciar si se produjo la reacción antígeno-anticuerpo.

Se repitió el protocolo para cada concentración del analito. El desplazamiento en la frecuencia del pico máximo dentro de la banda rechazada que se da lugar después de agregar los 45 uL adicionales de la solución de anticuerpo-PBS mostrará si el sensor fonónico es lo suficientemente sensible para desarrollar las mediciones. Sin embargo, es la diferencia entre la frecuencia de transmisión máxima de la medición de referencia y la medición después de introducir los 90 uL de PBS, lo que mostrará la respuesta real del sensor fonónico.

2.5 PROPUESTA DE UN PROTOCOLO MEJORADO CON BASE EN LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS EN MEDIOS LÍQUIDOS, USANDO SENSORES FONÓNICOS

Hasta ahora se ha presentado un sensor fonónico donde la muestra a evaluar se toma de la solución y se inserta en la cavidad resonante para sus mediciones. Esto implica que a medida que se van realizando soluciones se va extrayendo contenido de la solución, que en últimas podría disminuir significativamente la cantidad de solución respecto a cómo se inició.

Como resultado de este proyecto se identificó que el cristal puede realizar estas mediciones, la cuales están asociadas a los cambios en la velocidad del sonido en una cavidad resonante que es un modo de defecto en el cristal. La propuesta es que, para una futura versión, en vez de realizar toma de muestras en un repositorio de cultivo en la cavidad resonante, se modifiquen las dimensiones de esta cavidad para realizar el cultivo en medio líquido de esta cavidad, y poder realizar medidas continuamente, es decir, para que las mediciones sean en flujo. De manera que es necesario desarrollar el diseño de un cristal fonónico que permita que el cultivo prolifere en el cristal, en la cavidad resonante en la cual está el modo de defecto.

Durante este proceso se utilizaron soluciones salinas que son de bajo riesgo biológico, al utilizar un cultivo microbiológico aumenta este riesgo, así que se debería implementarse una mejora en la parte de limpieza. Así pues, la propuesta de un protocolo mejorado incluye tanto cambios en la estructura del sensor fonónico como en los pasos del lavado de la cavidad resonante, debido a que si se va a analizar un cultivo microbiológico se debe ser más cuidadoso con posibles contaminaciones cruzadas dentro de la cavidad y las demás capas de sensor fonónico. Se requiere unas mejoras como que el sensor fonónico pueda medir soluciones de manera no destructiva, es decir, sin tener perder contenido de la muestra.

Teniendo como base el protocolo que se diseñó en etapas previas, se pueden modificar algunos de los pasos para que se acomoden más a mediciones de cultivos microbiológicos

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

en sensores fonónicos, y no mediciones de otras soluciones no biológicas. Por ejemplo, el paso 4 indica que se debe verificar que la temperatura de la muestra sea de 22°C, sin embargo, cada cultivo debe tener condiciones específicas de temperatura diferentes de acuerdo al tipo de cultivo y tipo de microorganismo que se esté incubando, así que se debe controlar la temperatura del agua destilada para que esta no afecte la medición de referencia, pero además se debe adicionar un paso donde se controle también la temperatura del cultivo. De esta manera, se añade al protocolo la inserción de la muestra junto con el sensor a una cámara de temperatura controlada para cultivos de microorganismos, donde se pueda establecer específicamente la temperatura que sea necesaria.

Un protocolo mejorado podría ser el siguiente:

1. Realizar un lavado cuidadoso con agua destilada de la cavidad donde se ubica la muestra en el sensor fonónico.
2. Secar la cavidad donde se ubica la muestra en el sensor fonónico.
3. Introducir agua destilada para una realizar una primera medición que permita la calibración del sensor.
4. Verificar que la temperatura del agua destilada sea de 22°C para que la medida no se vea afectada por cambios en la temperatura.
5. Introducir el agua destilada en la cavidad donde se ubica la muestra en el sensor fonónico para realizar la medición de referencia.
6. Extraer el agua destilada de la cavidad resonante.
7. Introducir el caldo de cultivo dentro sensor fonónico
8. Introducir el sensor fonónico con el cultivo dentro de una cámara de temperatura controlada.
9. Asignar el valor de temperatura que debe tener el cultivo para su óptima proliferación, de acuerdo al tipo de microorganismo que se esté incubando.
10. Realizar 3 mediciones diferentes del cultivo, escoger cada cuánto tomar las mediciones siguientes, basándose en el tipo de cultivo que se tiene.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

3. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Una vez almacenados los datos obtenidos por el osciloscopio se procedió a realizar un procesamiento de cada una de las señales pues no todas las tomas tenían la misma amplitud debido a posibles interferencias destructivas con los sobretonos de la señal. Por lo tanto, se normalizaron cada una de las señales para poder ser comparadas entre ellas, aunque la frecuencia del pico con mayor amplitud es la variable realmente importante pues de esa manera es que se prueba el uso del sensor para estas aplicaciones.

En la Figura 13 se pueden observar los resultados obtenidos al aplicar soluciones de diferentes concentraciones de solución salina. Estas concentraciones variaron entre 4,148% y 5,265%, las cuales se calcularon a partir de velocidades encontradas en resultados de artículos de la búsqueda bibliográfica, donde a partir de la técnica de ultrasonido midieron la presencia de cultivos microbiológicos y productos metabólicos derivados de estos. Para calcular estas concentraciones se hizo uso de la Ecuación 2, propuesta por Kleis et al, la cual relaciona el porcentaje de salinidad de una muestra en términos de la velocidad del sonido y la temperatura, en donde la temperatura para este caso se asumió la temperatura ambiente de 22°C. Estas soluciones permiten observar el comportamiento del sensor en el rango deseado de velocidades del sonido para analizar cultivos microbiológicos.

Una de las características que se puede observar en el resultado es que hay presencia de una banda rechazada entre aproximadamente 350 KHz y 1.2 MHz, esta banda rechazada es característica de los cristales fonónicos lo que permite tener un rango apropiado de frecuencias en los cuales se atenúa el ruido, mejorando la relación señal a ruido (SNR) de las características relevantes de transmisión.

Alrededor de 800 KHz se puede observar un máximo de transmisión, este máximo de transmisión aparece debido a la introducción de un modo de defecto en el cristal fonónico, el modo de defecto es el que permite hacer seguimiento a un fluido o una sustancia que está introducida en él, en este caso es una cavidad resonante y la sustancia es el analito que queremos analizar, en este caso es solución salina.

Podemos ver cómo los cambios de concentración en la solución salina afectan la respuesta en frecuencia del cristal; a pesar de que toda la respuesta se ve afectada incluyendo los extremos de la banda rechazada, el interés en este proyecto se focaliza en el pico central ya que se ha demostrado en estudios anteriores que este es el más apropiado para utilizar como mesurando debido a la SNR, repetibilidad y factor de calidad del máximo.

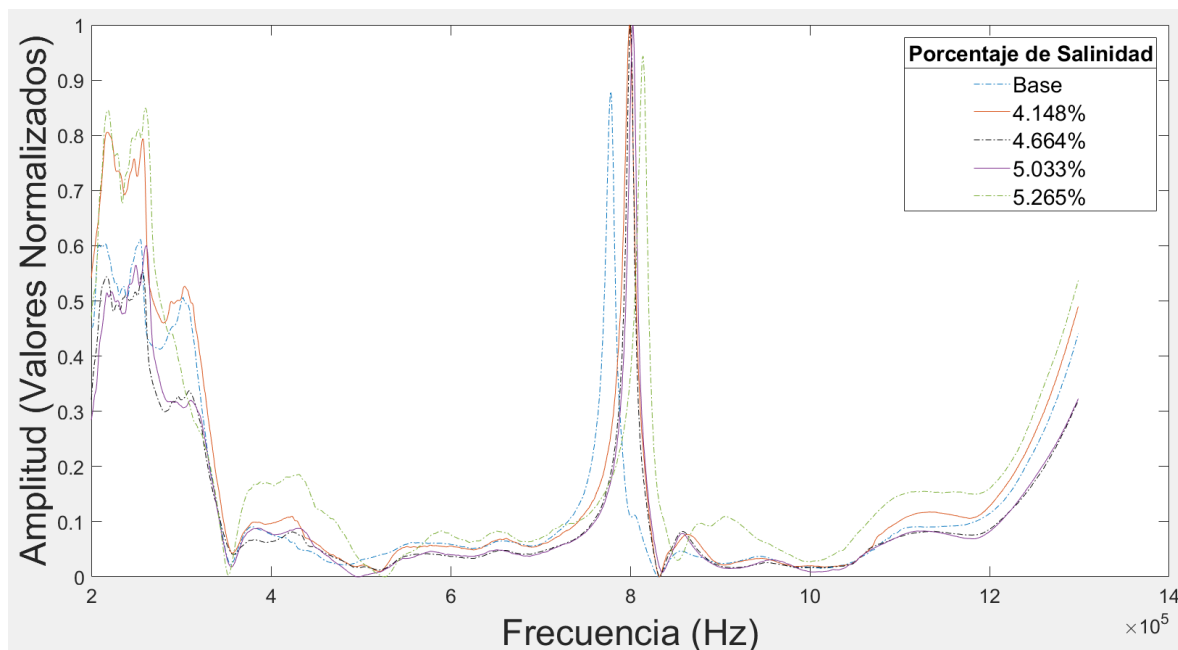


Figura 13. Resultados del primer experimento

Debido a que la diferencia entre las concentraciones era muy pequeña, a simple vista no se puede observar qué tanto se desplazaron los picos centrales. En la Figura 14 se encuentra un acercamiento del resultado de este primer experimento, el cual nos permite observar de mejor manera cómo se desplaza el pico a medida que se cambian las concentraciones.

Es claro cómo a medida que se va incrementando el porcentaje de concentración, el cual está directamente relacionado con la velocidad del sonido, se va desplazando el pico hacia frecuencias más altas; se puede apreciar una tendencia lineal, al incrementarse la concentración, también se observa un aumento en la frecuencia del pico. El desplazamiento es acorde a lo esperado, esto muestra que el sensor puede caracterizar soluciones salinas con estas concentraciones, lo cual da a entender que pueden ser utilizados en cultivos microbiológicos para caracterizarlos.

Se puede ver que la frecuencia del pico máximo de la solución base (agua destilada) es evidentemente menor al resto de muestras, a una frecuencia de aproximadamente 780 KHz. Asimismo, la frecuencia del pico máximo de la solución con mayor concentración (5,265%) se ve que es mayor a una frecuencia aproximadamente de 815 KHz.

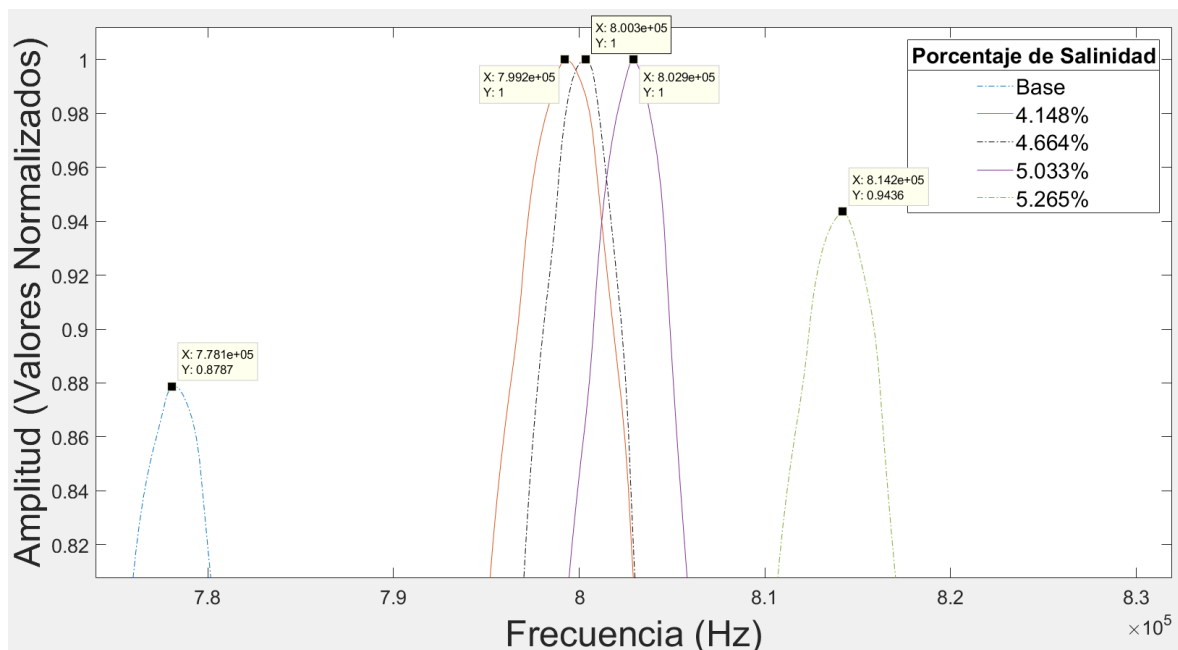


Figura 14. Acercamiento de los resultados del primer experimento

La Figura 15 muestra cómo se da el cambio de la variable de interés con respecto a la concentración. A medida que se va aumentando la concentración se ve cómo se incrementa la frecuencia del pico máximo de cada una de las muestras.

Las concentraciones varían entre 4,148% y 5,265%, la frecuencia varía entre 780 KHz y 815 KHz. Se presenta una gráfica de la relación entre las concentraciones y el desplazamiento de la frecuencia.

Se prevé que dicha relación sea lineal, y que entre mayor concentración de solución salina se tenga, mayor será el desplazamiento de la frecuencia del pico de transmisión relevante generado por la introducción del modo de defecto.

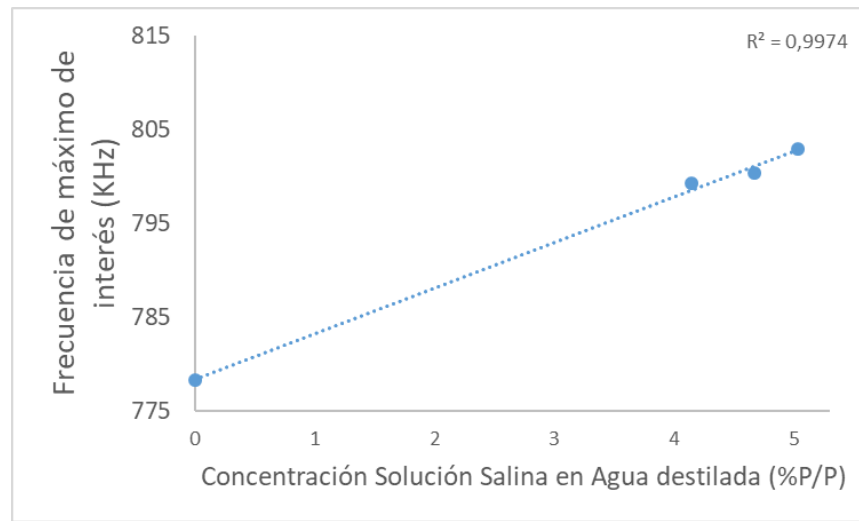


Figura 15. Frecuencia de aparición del máximo de interés respecto a la Concentración Salina en Agua destilada para el primer experimento

En cuanto a las mediciones hechas con glicerol, la relación lineal es evidentemente notoria; es decir, la Figura 16 muestra cómo el pico central se va trasladando a medida que va aumentando a medida que la concentración de glicerina va aumentando.

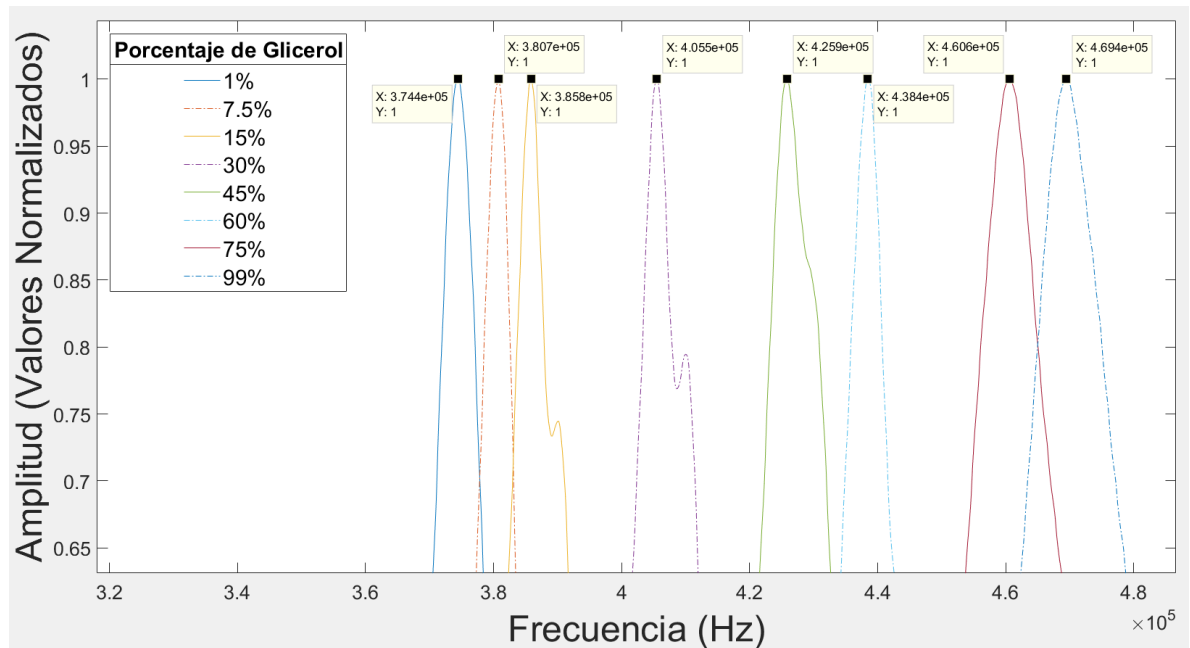


Figura 16. Acercamiento de los resultados del segundo experimento con Glicerol

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

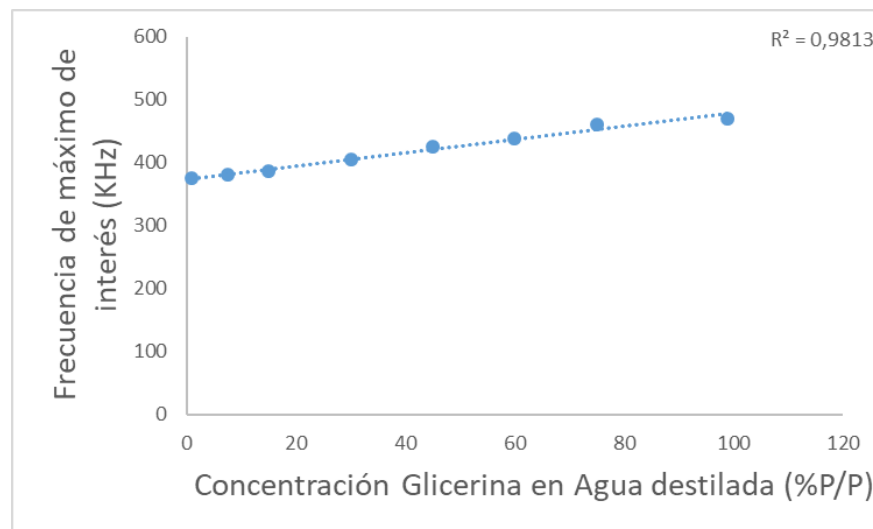


Figura 17. Frecuencia de aparición del máximo de interés respecto a la concentración de Glicerol en Agua destilada para el segundo experimento.

Los resultados obtenidos en estas pruebas son muy prometedores porque se planteó el uso de glicerol a modo de comparación con otra tecnología, los resultados encontrados en el uso de QCM entregaron que existe una concentración máxima de glicerol que satura el sensor y no permite continuar aumentando de concentración, esto limita la toma de las medidas, el cual se puede ver en la Figura 18, donde una concentración de glicerol al 45% es la máxima concentración aplicada a la Microbalanza de cristal de cuarzo. En la Figura 19, se puede ver la misma tendencia que los sensores fonónicos, a medida que aumenta la concentración de glicerol aumenta la frecuencia del analizador de impedancias (f_{ANA}), en valor absoluto, el cual es una diferencia entre la frecuencia aplicada y la frecuencia a la que vibra la Microbalanza de cristal de cuarzo a una masa dada (Montagut Ferizzola, 2011).

Para el caso de los sensores fonónicos no se presenta esta limitación. La Figura 17 presenta cómo se da la variación de la frecuencia del pico máximo con respecto a la concentración de glicerol, el Coeficiente de Determinación (R^2) de 0,98 indica una alta relación de las variables.

Tabla 5.12: Variación de la frecuencia de oscilación ($C_V = 6,8\text{pF}$)

Muestra	$\Delta f_{ANA}(\text{Hz})$	$\Delta f_{OSC}(\text{Hz})$
Agua	-2679	-3470
Glicerol 5%	-3029	-3881
Glicerol 15%	-3406	-4408
Glicerol 25%	-4255	-5331
Glicerol 35%	-6216	-7437
Glicerol 45%	-7323	-8563

Figura 18. Tabla donde se indican las diferentes concentraciones de glicerol usadas en el estudio de QCM (Montagut Ferizzola, 2011).

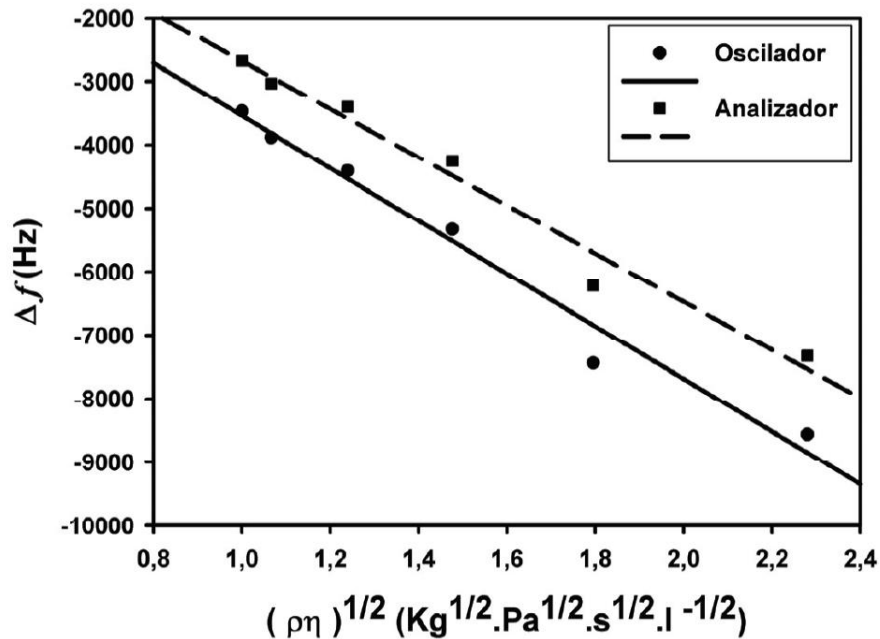


Figura 19. Resultados encontrados en el estudio de QCM con glicerol (Montagut Ferizzola, 2011).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

El cambio que se da en el pico central frecuencia producido por un cambio en la concentración de la muestra es debido a que hay un cambio en la velocidad del sonido en cada una de las muestras, así pues, la medida final que adquiere el sensor fonónico es la velocidad del sonido respectiva de los analitos. La velocidad del sonido del agua a una temperatura de 25°C es de 1493 m/s, del agua marina es de 1533 m/s y el del glicerol es de 1904 m/s (Rod Nave, 2009).

Experimentalmente se encontró que la velocidad del sonido del agua destilada es menor que la velocidad del sonido de la solución salina y el glicerol, esto se ve reflejado porque en todos los casos el pico central de frecuencia del agua destilada está más a la izquierda, o más cercano a cero, que el resto de muestras, y una mayor concentración del analito (sea solución salina o glicerol) presenta un pico central de frecuencia más a la derecha.

Los resultados experimentales encontrados responden al comportamiento característico en la frecuencia de los sensores fonónicos estudiado previamente por Lucklum et al, y Villa-Arango et al, la cual es una transmisión selectiva de ondas con bandas rechazadas ubicadas en diferentes rangos de frecuencia dependiendo de las propiedades de los materiales constituyentes y las dimensiones de las capas.

Los resultados que se obtuvieron en las mediciones son acordes con los resultados que se han encontrado en la bibliografía obtenido por B. Alouache et al. en la Figura 7, que muestra la velocidad del sonido respecto al tiempo que va transcurriendo a medida que se va dando la fermentación láctica en las bacterias de la leche, el cual indica un comportamiento y cambio en la velocidad del sonido de 8m/s (B. Alouache, 2015).

La respuesta en el sensor fonónico también muestra un cambio lineal, presentando la posibilidad de medir concentraciones de bacterias en cultivos. Algunos de los resultados presentados por investigadores tienen cambios menores o mayores de la velocidad del sonido dependiendo de lo que se esté viendo. El cristal fonónico muestra ser una técnica adecuada para realizar estas mediciones, se debe hacer un estudio más detallado para validar estadísticamente su funcionamiento, teniendo en cuenta que las pruebas realizadas en este trabajo de grado son prometedoras y congruentes a lo esperado. Como las mediciones se hicieron con una solución equivalente presentada como Solución Salina, al transcurrir el tiempo no se iba a presentar un cambio de concentración de la misma. Sin embargo, si se hace un símil con tiempo como si a medida que transcurre el tiempo, aumenta la concentración de la muestra, se puede hacer una comparación entre los resultados obtenidos en este trabajo y los resultados obtenidos por B. Alouache et al.

Si se observa la Figura 20, en donde la imagen de la izquierda se pueden ver los resultados de B. Alouache et al, y la imagen de la derecha que son las medidas tomadas con el sensor fonónico y la solución equivalente planteada, se puede observar la misma tendencia, un aumento en la velocidad del sonido de las muestras. Si bien los ejes no son los mismos, se pueden comparar porque de eje Y de los resultados obtenidos por B. Alouache et. al se hace una medición directa de la velocidad del sonido y en el mismo eje de los resultados obtenidos en este trabajo se mide la frecuencia de aparición del máximo a partir de cambios en la velocidad del sonido de la muestra. Asimismo, el eje X de B. Alouache et. al es el

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

tiempo representando el tiempo de crecimiento y aumento en la concentración del cultivo que se estaba analizando, y en el mismo eje de los resultados en este trabajo no se puede medir el tiempo que transcurre pues la solución salina no va a aumentar su concentración a medida que pasa el tiempo, pero un aumento de concentración hace alusión a un aumento en la concentración del cultivo y se hace un símil entre estos dos.

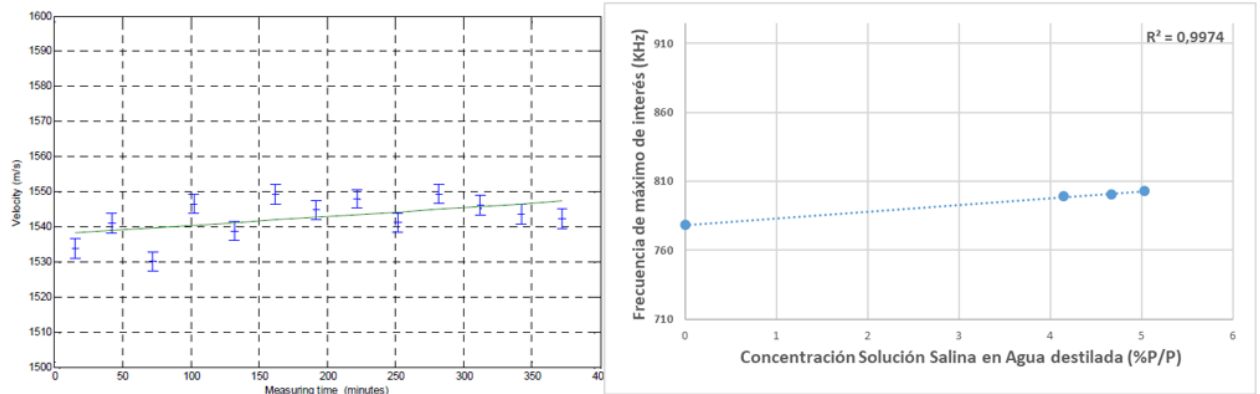


Figura 20. Comparación de uno de los resultados encontrados en la bibliografía con los resultados presentados en este trabajo.

Durante la experimentación se obtuvieron muchos resultados que no eran acordes al comportamiento esperado el cristal fonónico, y que tuvieron que ser repetidos los ensayos debido a que al realizar las soluciones de solución salina se encontraban dificultades para obtener la cantidad exacta de soluto y posiblemente no se agregaron las cantidades de NaCl adecuadas. Se recomienda para obtener mejores resultados en este tipo de soluciones utilizar volúmenes iniciales mayores.

Proceso de inmovilización de agentes de reconocimiento en cristales fonónicos

Durante la inmovilización de anticuerpos BSA en la cavidad resonante de las paredes de vidrio del sensor fonónico se obtuvieron los siguientes resultados. Al cambiar la concentración de BSA que se introduce en el sensor fonónico se da un cambio en la respuesta en frecuencia de dicho sensor. Los resultados que se muestran a continuación fueron los que se publicaron en el artículo "Phononic crystal biosensors: functionalization of resonant cavities to enhance selectivity in challenging applications". Estas experimentaciones se hicieron en apoyo al proyecto desarrollado por Sebastián Uribe Ocampo y Simón Villa Arango en el grupo de investigación en ingeniería biomédica GIBEC de la Universidad EIA.

Se realizó una prueba experimental utilizando cuatro soluciones de BSA en solución amortiguadora PBS con una concentración diferente. Los resultados de esta prueba se pueden observar en la Figura 21. Los datos de transmisión se adquirieron después de 20 minutos de haber introducido el analito en la cavidad resonante.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

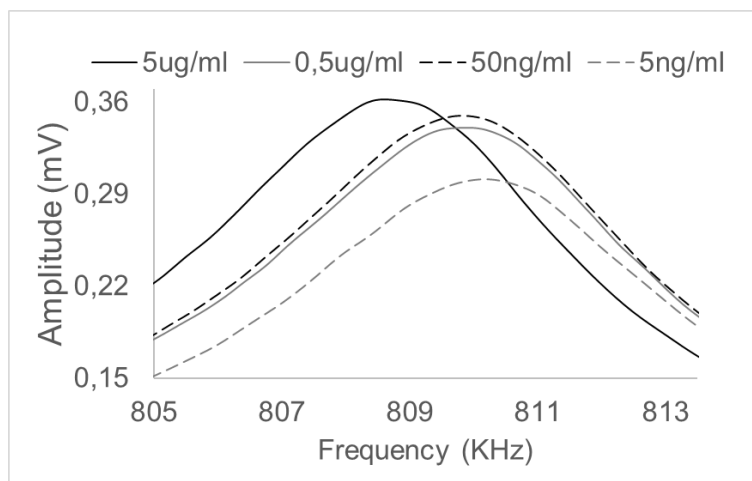


Figura 21. Resultados experimentales del sensor fonónico como biosensor utilizando diferentes concentraciones de soluciones de BSA en solución amortiguadora PBS.

Aunque los cambios en la concentración del analito son muy pequeños, los desplazamientos en la frecuencia de transmisión son visibles en los resultados experimentales. La Figura 22 muestra la frecuencia del máximo de transmisión en cada concentración. Cuando aumenta la concentración, se da un desplazamiento en el pico de transmisión máximo a frecuencias más bajas. Los resultados son muy prometedores y muestran que el biosensor PnC tiene una sensibilidad muy alta.

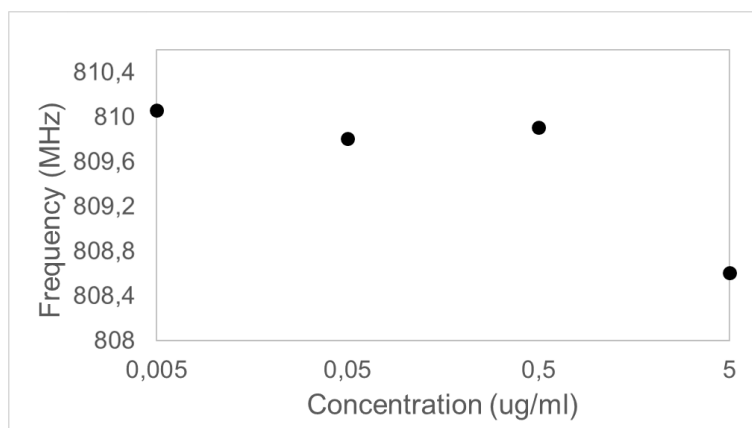


Figura 22. Frecuencia del pico máximo de transmisión del sensor fonónico como biosensor utilizando diferentes concentraciones de soluciones de BSA en solución amortiguadora PBS

Las medidas tomadas después de 20 minutos muestran que el cristal fonónico es lo suficientemente sensible como para poder detectar pequeños cambios en la concentración del analito. Después de los 20 minutos, el agente de reconocimiento se ha unido a los anticuerpos BSA. Para evaluar si este proceso ocurrió de hecho, se tomó una medida de control después de lavar la cavidad resonante cinco veces y finalmente llenarlo con una solución amortiguadora PBS sin BSA.

La Figura 23 muestra cómo el pico de transmisión de la solución de 50 ng/mL cambia después de 5 y 20 minutos de introducción del analito y, finalmente, después del lavado y la adición de una nueva solución amortiguadora PBS. La medición de control con el búfer se ubica entre las mediciones de 5 minutos y 20 minutos. Los resultados obtenidos con esta prueba, demuestran que hubo una reacción antígeno-anticuerpo y que parte de los anticuerpos BSA que estaban en la solución permanecieron en el cristal fonónico después de ser lavados. La misma prueba se realizó con las otras concentraciones con el mismo efecto.

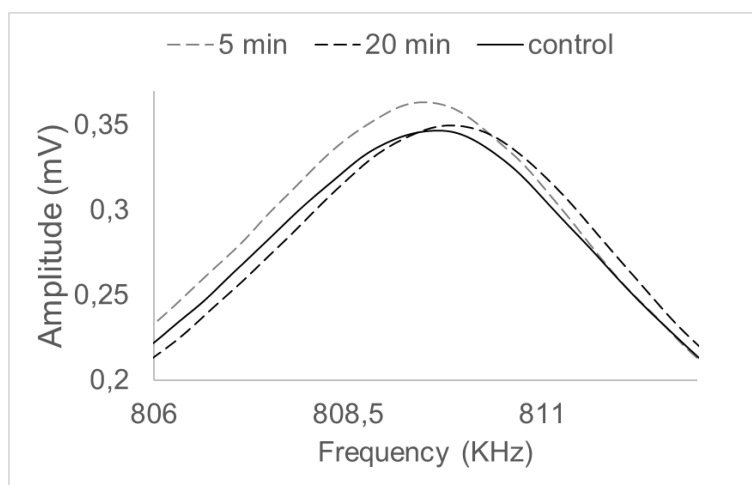


Figura 23. Medición de control del sensor fonónico como biosensor con una solución de BSA en PBS a una concentración de 50 ng/mL

Se realizó un nuevo estudio experimental con concentraciones de BSA más desafiantes en la solución amortiguadora PBS. La Figura 24 muestra los resultados obtenidos durante esta prueba. Al igual que en las mediciones después de los 20 minutos de introducción del analito, estos resultados muestran que la concentración es inversamente proporcional a la frecuencia de transmisión máxima del sensor fonónico. Los resultados muestran que aún se necesita mejorar el cristal para poder ser utilizado de manera efectiva en las pruebas de PoC. Sin embargo, son muy prometedores ya que la sensibilidad del biosensor PnC es muy alta.

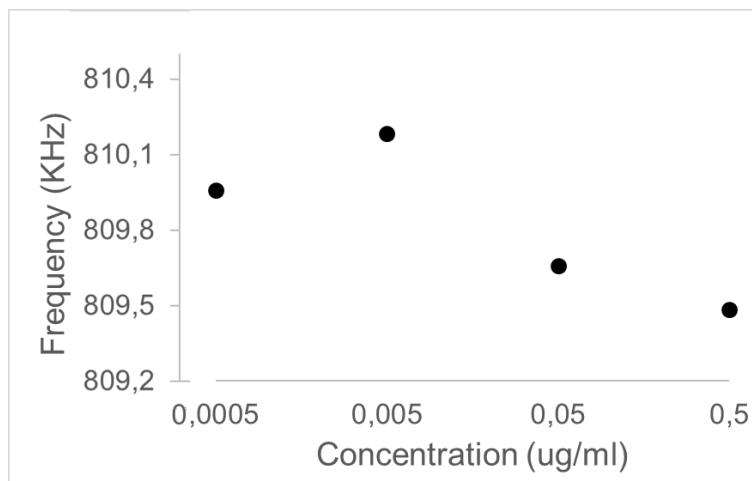


Figura 24. Frecuencia del pico de máxima transmisión del sensor fonónico como biosensor utilizando diferentes concentraciones de soluciones de BSA en solución amortiguadora PBS. Los datos se adquirieron después de lavar el biosensor PnC e introducir PBS en la cavidad resonante.

Los resultados experimentales muestran que la estrecha banda de transmisión generada por la cavidad resonante y que se encuentra en el centro del intervalo de banda rechazada, sufre un desplazamiento en la frecuencia cuando se miden diferentes concentraciones de las soluciones anti-BSA en PBS utilizando el biosensor de cristal fonónico.

4. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

Los cristales fonónicos son una tecnología que resulta ser prometedora para pruebas cerca al paciente (PoCT). Se pudo evidenciar que con cambios pequeños en las concentraciones de la muestra el sensor logra detectar estos cambios por medio del desplazamiento en el pico máximo de frecuencia, lo que significa que para evaluar un cultivo celular basta con esperar que en el cultivo haya un crecimiento celular para tomar las mediciones, pero no es necesario que llegue al punto que deba verse por el microscopio, así que el tiempo de espera disminuye considerablemente.

Adicionalmente, se presenta un nuevo biosensor de cristal fonónico que, mediante el uso de un agente de biorreconocimiento, puede medir pequeños cambios de una proteína específica. El sensor fonónico tiene una capa de defecto en el medio que configura una cavidad resonante. Los resultados experimentales que evalúan el rendimiento del sensor fonónico multicapa mostraron que la funcionalización de la cavidad resonante que lleva el analito de interés es un enfoque excelente para mejorar la especificidad de los sensores de cristal fonónico. Pequeñas variaciones en las propiedades del analito pueden producir desplazamientos en la frecuencia de transmisión máxima del modo de defecto en el sensor fonónico.

La modificación de las paredes de la cavidad resonante hace que el sensor fonónico tenga una gran afinidad hacia una proteína específica. Por lo tanto, los cambios en la frecuencia se ven principalmente afectados por el acoplamiento de la proteína específica al agente de reconocimiento y no por otros elementos presentes en la muestra. El uso de un proceso de funcionalización abre la posibilidad de usar sensores de cristal fonónico en aplicaciones donde los analitos diana deben detectarse en mezclas complejas como, por ejemplo, en aplicaciones de punto de atención patógenos específicos, y las proteínas deben detectarse en sangre u otros elementos biológicos fluidos.

El sensor fonónico mostró una sensibilidad considerable y las características de transmisión relevantes que se utilizan para caracterizar el sensor tienen una relación señal/ruido muy alta, por lo tanto, facilita el uso de sistemas de caracterización electrónica más simples y permite su uso en aplicaciones de campo.

Los estudios en curso se centran en mejorar el proceso de funcionalización y la configuración experimental con el fin de mejorar la repetibilidad de las mediciones y ser capaces de desarrollar aplicaciones competitivas reales con sensores fonónicos biofuncionalizados.

Los frutos de este trabajo dieron pie a una publicación como coautora en un evento especializado internacional con el nombre de “Phononic crystal biosensors: functionalization of resonant cavities to enhance selectivity in challenging applications”, S. Villa-Arango, S. Uribe-Ocampo, **S. Ocampo**, Y. Montagut, R. Torres, J.E. Betancur-Ochoa, P. A. Kyriacou, presentado en el Congreso ENPPC#3 – en Egipto, 2018. Adicional a esto, se envió a la revista “Biosensors y Bioelectronics” para su consideración.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

REFERENCIAS

- Abel Castaño, R. (s.f.). *Diagnóstico Resolutivo y PoCT: Innovaciones para beneficio de los pacientes y los sistemas de salud*. Obtenido de https://www.alere.com/content/dam/web/alere-com/es/COPremio/Boletin_B15_C2_web-VERSION-FINAL.pdf
- B. Alouache, A. T. (2015). Monitoring of Lactic Fermentation Process by Ultrasonic Technique. *Physics Procedia*, 1057–1060.
- Bautista, L. (2018). *Fisicanet*. Obtenido de Ondas Sonoras: https://www.fisicanet.com.ar/fisica/sonido/ap03_sonido.php
- Benintende, S., & Sanchez, C. (s.f.). *Cátedra Microbiología Agrícola . Obtenido de Crecimiento Bacteriano* : http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf
- Biocompare. (2018). *Biocompare*. Obtenido de Anti-BSA Antibody Products: <https://www.biocompare.com/pfu/110447/soids/28792/Antibodies/BSA>
- Cañada, P. (2011). *Unidad de Cultivos Celulares*. Obtenido de http://www.scai.uma.es/servicios/ciencias_vida/cce/cce.html
- Casarotto, R. A., Adamowski, J. C., & Fallopa, F. (2004). Coupling Agents in Therapeutic Ultrasound: Acoustic and Thermal Behavior. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 162-165.
- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2012). Ultrasonics in food processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 975–983.
- Clínica Universidad de Navarra. (2015). *Clínica Universidad de Navarra*. Obtenido de <http://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/impedancia-acustica>
- D. Sandín, G. A. (2008). *Métodos de estudio de bacterias y virus*. Obtenido de Métodos diagnósticos: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MetodosdeEstudiodeBacteriasyVirus.pdf>
- De La Cruz Reyes, L. A. (29 de Marzo de 2016). *Ingeniería Electrónica.org*. Obtenido de Definición de Frecuencia, período y amplitud: <https://ingenieriaelectronica.org/definicion-de-frecuencia-periodo-y-amplitud/>
- E. Ouacha, A. M. (2015). Ultrasonic evaluation of UHT milk quality after opening. *Materials Today: Proceedings*, 4684–4688.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

- Foro Técnico para instaladores de fibra óptica. (2014). *Fenómenos de la Luz*. Obtenido de <https://www.fibraoptica hoy.com/blog/fenomenos-de-la-luz/>
- Hazen C., K. (2017). *Diagnóstico de las enfermedades infecciosas*. Obtenido de <http://www.msmanuals.com/es-co/hogar/infecciones/diagn%C3%B3stico-de-las-enfermedades-infecciosas/diagn%C3%B3stico-de-las-enfermedades-infecciosas>
- Iáñez, E. (17 de Agosto de 1998). *Hipertextos del Área de la Biología*. Obtenido de Curso de Microbiología General: http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/01_micro.htm
- Instituto Nacional de Ecología Y Cambio Climático. (s.f.). *GLICEROL*. Obtenido de Datos de Identificación: <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/Glicerol.pdf>
- iWonder. (1 de Agosto de 2015). *BBC Mundo*. Obtenido de http://www.bbc.com/mundo/noticias/2015/08/150707_iwonder_louis_pasteur_guerra_contra_germenes_finde_dv
- L. Elvira, C. S. (2010). Ultrasonic non invasive techniques for microbiological instrumentation. *Physics Procedia*, 789-794.
- Lafuente Aranda, G. (Junio de 2017). *TRABAJO DE FIN DE MÁSTER . Obtenido de GLICEROL: SÍNTESIS Y APLICACIONES:* http://espacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Glafuente/Lafuente_Aranda_Gustavo_TFM.pdf
- Lucklum, F., & Vellekoop, M. J. (2016). Band gap characterization of complex unit cell geometries for 3D phononic crystals. *IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*, 1-4.
- Maldovan, M. (2013). Sound and heat revolutions in phononics. *Nature. International Journal of Science*, 209–217. Obtenido de <https://www.nature.com/articles/nature12608/figures/2>
- McAdam J., A., & Onderdonk B., A. (2016). Principios de Medicina Interna.
- Minion, J., Sohn, H., & Pai, M. (2009). Light-emitting diode technologies for TB diagnosis: what is on the market? *Med. Devices*, 341-345.
- Miyara, F. (2000). *COMITÉ CIENTÍFICO INTERDISCIPLINARIO DE ECOLOGÍA Y RUIDO . Obtenido de LA NATURALEZA DEL SONIDO:* http://www.eumus.edu.uy/eme/ensenanza/acustica/apuntes/material-viejo/fisica_r/
- Montagut Ferizzola, Y. J. (2011). Sistema Oscilador Mejorado para Aplicaciones de Microbalanza (QCM) en Medios Líquidos y Propuesta de un Nuevo Método de

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Caracterización para Biosensores Piezoeléctricos. *Tesis Doctoral*. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA.

- Montagut, Y., García, J., Jiménez, Y., March, C., Montoya, A., & Arnau, A. (2011). QCM Technology in Biosensors. *Biosensors - Emerging Materials and Applications*.
- Mubarok, A. Z., Mani, V., Huang, C.-H., Chang, P.-C., & Huang, S.-T. (2017). Label-free electrochemical detection of neuraminidase activity: A facile whole blood diagnostic probe for infectious diseases. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 641-648.
- Nagel, T., Ehrentreich-Förster, E., Singh, M., Schmitt, K., Brandenburg, A., Berka, A., & F. Bier, F. (2008). Direct detection of tuberculosis infection in blood serum using three optical label-free approaches. *Sensors and Actuators B Chemical*, 934-940.
- Norma Técnica Colombiana. (09 de Diciembre de 2015). NTC 6154. *Pruebas cerca al paciente (Point of Care Testig - POCT). Requisitos para la calidad y competencia*.
- OMS. (2017). *Influenza*. Obtenido de Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS): http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en/#
- OMS. (2017). *Reglamento Sanitario Internacional*. Obtenido de Red Mundial de Alerta y Respuesta ante Brotes Epidémicos (GOARN): http://www.who.int/ihr/alert_and_response/outbreak-network/es/
- OMS. (2017). *Temas de salud*. Obtenido de Reglamento Sanitario Internacional (RSI): http://www.who.int/topics/international_health_regulations/es/
- Ospina, S. (2016). Foro: Impacto de la implementación de Exámenes al Lado del Paciente (PoCT).
- R. Rodríguez-Herrera, C. N.-G.-L.-R.-G.-H. (2009). *DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES*. Obtenido de Universidad Autónoma de Coahuila: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%201/AQMmicroorganismos.html>
- Resa, P., Bolumar, T., Elvira, L., Pérez, G., & Montero de Espinosa, F. (2007). Monitoring of lactic acid fermentation in culture broth using ultrasonic velocity. *Journal of Food Engineering*, 1083-1091.
- Rod Nave, C. (2009). *Velocidad del Sonido en Diferentes Medios*. Obtenido de <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/Tables/Soundv.html>
- Rod Nave, C. (2009). *Velocidades de Ondas*. Obtenido de <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/Sound/souspe2.html>

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

- S. J. Kleis, L. A. (1990). DEPENDENCE OF SPEED OF SOUND ON SALINITY AND TEMPERATURE IN CONCENTRATED NaCl SOLUTIONS. *Solar Energy*, 201-206.
- S. Villa-Arango, R. T. (2017). Fully-disposable multilayered phononic crystal liquid sensor with symmetry reduction and a resonant cavity. *Measurement*, 20-25.
- Steele, L., Orefuwa, E., & Dickmann, P. (2016). Drivers of earlier infectious disease outbreak detection: a systematic literature review. *International Journal of Infectious Diseases*, 15-20.
- T.S. Awad, H. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 410-427.
- TECSUP. (2018). *CIENCIAS BÁSICAS APLICADAS*. Obtenido de Fenómeno de las ondas - Refracción: <https://sites.google.com/a/tecsup.edu.pe/fisica-basica/0-5-fenomeno-de-las-ondas/b-refraccion>
- Universidad de Vigo, Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. (25 de Agosto de 2018). *Atlas de histología vegetal y animal*. Obtenido de La célula. 3. Membrana celular. LÍPIDOS: <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/3-lipidos.php>
- Villa-Arango, S., Betancur Sánchez, D., Torres, R., Kyriacou, P., & Lucklum, R. (2017). Differential Phononic Crystal Sensor: Towards a Temperature Compensation Mechanism for Field Applications Development. *Sensors*.
- Villa-Arango, S., Torres Villa, R., & Kyriacou, P. A. (2016). Cavity Resonance Sensor With Disposable Analyte Container for Point of Care Testing. *IEEE SENSORS JOURNAL*, 6727-6732.
- Viñuelas-Bayón, J., Vitoria, M. A., & Samper, S. (2017). Rapid diagnosis of tuberculosis. Detection of drug resistance mechanisms. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 518-526.
- Waggoner, B. (s.f.). *Antony van Leeuwenhoek (1632-1723)*. Obtenido de <http://www.ucmp.berkeley.edu/history/leeuwenhoek.html>
- Young, H. D., & A., F. R. (2009). *Física Universitaria Volumen 1*. Naucalpan de Juárez: Pearson Education.
- Young, H., & Freedman, R. A. (2009). *Física Universitaria con Física Moderna*. México: PEARSON.

Anexo 1. Códigos de MATLAB para el procesamiento y Visualización de los Datos.

Los siguientes códigos son funciones que se crearon, así como se hicieron uso de las funciones integradas de MATLAB para procesar cada una de las variables adquiridas por el sensor fonónico.

1. Interpolación

```
function matrix = interpol(a,r)

    matrix(:,1) = interp(a(:,1),r);
    matrix(:,2) = interp(a(:,2),r);

    end
```

2. Filtro de media móvil

```
function matrix = media_movil(a,r)

    matrix(:,1) = movmean(a(:,1),r);
    matrix(:,2) = movmean(a(:,2),r);

    end
```

3. Normalización de los datos

```
function matrix = normalizar(a_1)

    matrix(:,1) = a_1(:,1);

    [m,n] = size(a_1);

    norm = zeros(m,n);

    for j=1:m

        norm(j,2) = a_1(j,2) - min(a_1(:,2));

    end
```

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

```
matrix(:,2) = norm(:,2)./max(norm(:,2));  
end
```